(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2005年3月24日 (24.03.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/025616 A1

(51) 国際特許分類^7: A61K 39/395, A61P 25/28

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/013397

(22) 国際出願日: 2004年9月8日 (08.09.2004)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2003-317443 2003年9月9日 (09.09.2003) JP

(71) 出願人 *(米国を除く全ての指定国について)*: 武田薬品工業株式会社 (TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED) [JP/JP]; 〒5408645 大阪府大阪市中央区道修町四丁目１－１ Osaka (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 *(米国についてのみ)*: 東海林 幹夫 (SHOJI, Mikio) [JP/JP]; 〒7038275 岡山県岡山市門田屋敷２－２－５１ 合同・東山宿舎１－１０１ Okayama (JP). 浅見 麻乃 (ASAMI, Asano) [JP/JP]; 〒3050047 茨城県つくば市千現２－１２－１４ Ibaraki (JP). 鈴木 伸宏 (SUZUKI, Nobuhiro) [JP/JP]; 〒5620001 大阪府箕面市箕面４－１６－６１ Osaka (JP).

(74) 代理人: 小林 浩, 外(KOBAYASHI, Hiroshi et al.); 〒1040028 東京都中央区八重洲二丁目８番７号 福岡ビル９階 阿部・井窪・片山法律事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 *(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 *(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
- 国際調査報告書
- 請求の範囲の補正の期限前の公開であり、補正書受領 の際には再公開される。

２文字コード及び他の略語については、定期発行される各*PCT*ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

WO 2005/025616 A1

(54) Title: USE OF ANTIBODY

(54) 発明の名称: 抗体の用途

(57) Abstract: It is intended to provide a preventive/remedy for Alzheimer' s disease. More specifically speaking, it is intended to provide a preventive/remedy for Alzheimer' s disease and so on which contains a monoclonal antibody reacting specifically with a partial peptide in the C-terminal side of β-amyloid or its derivative.

(57) 要約: 本発明はアルツハイマー病の予防・治療剤の提供を目的とする。具体的には、本発明はβ-アミロイドまたはその誘導体のＣ端側の部分ペプチドに特異的に反応するモノクローナル抗体を含有してなるアルツハイマー病などの予防・治療剤を提供する。

明細書

抗体の用途

技術分野

本発明は、アルツハイマー病などの予防・治療剤あるいは診断剤などに関する。更に詳しくは、β－アミロイド（Ａβ）またはその誘導体のＣ端側の部分ペプチドに特異的に反応するモノクローナル抗体を含有してなるアルツハイマー病などの予防・治療剤あるいは診断剤などに関する。

背景技術

アルツハイマー病による老人性痴呆は大きな社会的問題となっており、アルツハイマー病の予防・治療方法の早期確立が望まれている。アルツハイマー病患者の脳に特徴的な病変として、老人斑アミロイドの過剰な形成および神経原線維変化が知られており、これらのうち老人斑の主要な構成成分の一つがβ－アミロイドまたはその誘導体である。

β－アミロイドは、約４０～４３個のアミノ酸からなるペプチドであり、アミロイド前駆体蛋白質（Amyloid Precursor Protein：以下、ＡＰＰと称する）の細胞膜貫通領域の近傍にコードされている。各β－アミロイドのアミノ酸配列は以下のとおりである。

β－アミロイド（１－３８）＝配列番号：１
β－アミロイド（１－３９）＝配列番号：２
β－アミロイド（１－４０）＝配列番号：３
β－アミロイド（１－４１）＝配列番号：４
β－アミロイド（１－４２）＝配列番号：５
β－アミロイド（１－４３）＝配列番号：６

さらに最近では、β－アミロイドのなかでも、大脳実質中（老人斑）にはβ－アミロイド（１－４２）が主に早期から沈着し、一方脳血管にはβ－アミロイド（１－４０）が主に沈着する（アミロイドアンギオパチー）ことが報告され〔アーチブス　オブ　バイオケミストリー　アンド　バイオフィジックス（Arch.

Biochem. Biophys.），301, 41-53, 1993〕、β－アミロイド（１－４２）、β－アミロイド（２６－４２）、β－アミロイド（２６－４３）、β－アミロイド（３４－４２）などのＣ端部分を含むペプチドが種となって、水溶性のβ－アミロイド（１－４０）などの沈着を招くことなどが示唆されている〔バイオケミストリー（Biochemistry），32, 4693-4697, 1993〕。したがって、β－アミロイド（ｘ－４２）の沈着がアルツハイマー病においては最も重要な病因と考えられており、このような報告から、β－アミロイド（ｘ－４０）とβ－アミロイド（ｘ－４２）との沈着様式の相違がアルツハイマー病に大きく関与していると考えられる。

このため、β－アミロイド（ｘ－４０）とβ－アミロイド（ｘ－４２）とを感度よく分別定量することが重要であると考えられ、β－アミロイドまたはその誘導体のＣ端側の部分ペプチドに特異的に反応する抗体ならびに該抗体を用いるＣ端部疎水的領域を有するβ－アミロイドの測定方法がWO 94/17197号公報に報告されているが、該抗体による直接的なアルツハイマー病の予防・治療効果は知られていない。

一方、β－アミロイドワクチンによる直接的なアルツハイマー病の治療に関しては、例えば、ネイチャー(Nature), 400, 173-177, 1999、ネイチャー　メディシン(Nature Medicine), 9 (4), 448-452, 2003などに報告があるが、ヒトAPPトランスジェニックマウスなどを用いた前臨床試験で、老人斑の減少、学習能力の向上などの成功をもたらし、画期的な治療法として期待されたにもかかわらず、最近の第II相臨床試験において、予期せぬ重篤な副作用を招いた。死亡例をももたらした重篤な副作用の主たる原因は、通常のアルツハイマー病には見られない$CD4^+$リンパ球の脳内浸潤による脳炎の発症と考えられている。

免疫療法の結果、脳内に沈着した老人斑が劇的に減少し、認知能力の改善も見られることはヒトでも確認されているため〔ニューロン(Neuron), 38, 547-555, 2003〕、この長所を生かしつつ副作用を回避するための選択肢のひとつとして、抗β－アミロイド抗体を末梢投与する受動免疫が考えられ、モノクローナル抗体を用いた動物レベルでの検討が行われている〔サイエンス(Science), 295, 2264-2267, 2002、ネイチャー　ニューロサイエンス(Nature Neuroscience), 5,

452-457,2002〕。しかし、脳アミロイドアンギオパチー（ＣＡＡ）モデル・マウスを用いた検討では、抗Ｎ末端β－アミロイド抗体の投与により、ＣＡＡに起因する脳血管からの出血の増悪が報告されている〔サイエンス(Science), 298, 1379, 2002〕。

β－アミロイドのN末端または中間部をエピトープとする抗体を用いた動物レベルでの受動免疫の実験においては、血中β－アミロイド濃度の上昇は報告されているが〔サイエンス（Science），295巻, 2264-2267頁, 2002年、ネイチャーニューロサイエンス（Nature Neuroscience），5巻, 452-457頁,2002年、ネイチャー　メディシン (Nature Medicine), 8, 1263-1269, 2002、およびプロシーディングス　オブ　ザ　ナショナル　アカデミー　オブ　サイエンシズ　オブ　ザ　ユーエスエー(Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA), 100, 2023-2028, 2003〕、凝集性の高いβ－アミロイド（ｘ－４２）の血中濃度を特異的に上昇させたという免疫療法の報告はない。

発明の開示

β－アミロイドがアルツハイマー病の原因物質の一つである可能性が指摘され、β－アミロイドに深い関心が寄せられているにもかかわらず、有効な予防・治療法が確立されていないのが現状である。また、アルツハイマー病の免疫療法に関しても、β－アミロイドのＮ端側、中間部、またはβ－アミロイド（ｘ－４０）のＣ端部の部分ペプチドに特異的に反応する抗体では、例えば、脳血管壁に沈着したβ－アミロイド（ｘ－４０）（ＣＡＡ）に対する炎症を惹起し、脳内出血をもたらす危険があるなどの点を考慮すると、必ずしも十分に安全なアルツハイマー病の予防・治療方法であるとは言えない。

このように、より有効でかつ安全なアルツハイマー病の予防・治療法が切望されているのが現状である。

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、β－アミロイドのＣ端側の部分ペプチドに特異的に反応するモノクローナル抗体ＢＣ-０５ａをアルツハイマー病のモデル・マウスに皮下投与した所、意外にも、脳内のβ－アミロイドの沈着が抑制され、β－アミロイド（ｘ－４０）の血液中の濃度を

増加させることなく、β－アミロイド（x－４２）のみの血液中の濃度を選択的に増加させることを見出し、これらの知見に基づいて、更に研究を進めた結果、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、

（１）β－アミロイドまたはその誘導体のＣ端側の部分ペプチドに特異的に反応し、かつ配列番号：８で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識しないモノクローナル抗体を含有してなるアルツハイマー病、軽度認知障害または脳アミロイドアンギオパチーの予防・治療剤、

（２）アルツハイマー病の予防・治療剤である前記（１）記載の剤、

（３）抗体が配列番号：９で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識しない抗体である前記（１）記載の剤、

（４）抗体が配列番号：９で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識する抗体である前記（１）記載の剤、

（５）β－アミロイドが配列番号：１、配列番号：２、配列番号：３、配列番号：４、配列番号：５または配列番号：６で表されるアミノ酸配列を有するペプチドである前記（１）記載の剤、

（６）β－アミロイドが配列番号：５で表されるアミノ酸配列を有するペプチドである前記（１）記載の剤、

（７）β－アミロイドの誘導体が、配列番号：５で表されるアミノ酸配列の２番目～４２番目のアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号：５で表されるアミノ酸配列の３番目～４２番目のアミノ酸配列を有するペプチドであってＮ端のグルタミン酸がピログルタミン酸に変換したペプチド、または配列番号：５で表されるアミノ酸配列の４番目～４２番目のアミノ酸配列を有するペプチドである前記（１）記載の剤、

（８）β－アミロイドの誘導体が、配列番号：１ないし配列番号：６で表される各々のアミノ酸配列から１番目～１０番目のアミノ酸配列が欠如したアミノ酸配列を有するペプチドであってＮ端のグルタミン酸がピログルタミン酸に変換したペプチドである前記（１）記載の剤、

（９）β－アミロイドまたはその誘導体のＣ端側の部分ペプチドが、各β－アミ

ロイドのＮ端のアミノ酸から数えて２５番目以降のアミノ酸配列を有する部分ペプチドである前記（１）記載の剤、

（１０）抗体が配列番号：７で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識しない抗体である前記（１）記載の剤、

（１１）抗体が配列番号：５で表されるアミノ酸配列を有するβ－アミロイド（１－４２）を認識する抗体である前記（１）記載の剤、

（１２）抗体が、ＢＡ－２７（ＦＥＲＭ　ＢＰ－４１３９）で標示されるハイブリドーマ細胞から産生されうるモノクローナル抗体ＢＡ－２７ａである前記（１）記載の剤、

（１３）抗体が、ＢＣ－０５（ＦＥＲＭ　ＢＰ－４４５７）で標示されるハイブリドーマ細胞から産生されうるモノクローナル抗体ＢＣ－０５ａである前記（１）記載の剤、

（１４）抗体が、脳血液関門を透過する抗体である前記（１）記載の剤、

（１５）抗体が、形成された老人斑からβ－アミロイドを引き抜きうる抗体である前記（１４）記載の剤、

（１６）β－アミロイドの脳内での凝集または沈着の抑制剤である前記（１）記載の剤、

（１７）配列番号：５で表されるアミノ酸配列を有するペプチドの血中濃度を特異的に上昇させうる前記（１）記載の剤、

（１８）抗体が、脳血液関門を透過しない抗体である前記（１）記載の剤、

（１９）抗体が、末梢中のβ－アミロイドを末梢で捕捉しうる抗体である前記（１８）記載の剤、

（２０）哺乳動物に対して、β－アミロイドまたはその誘導体のＣ端側の部分ペプチドに特異的に反応し、かつ配列番号：８で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識しないモノクローナル抗体の有効量を投与することを特徴とするアルツハイマー病、軽度認知障害または脳アミロイドアンギオパチーの予防・治療方法、

（２１）アルツハイマー病、軽度認知障害または脳アミロイドアンギオパチーの予防・治療剤を製造するためのβ－アミロイドまたはその誘導体のＣ端側の部分

ペプチドに特異的に反応し、かつ配列番号：８で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識しないモノクローナル抗体の使用、

（２２）抗体が、配列番号：５で表されるアミノ酸配列を有するβ－アミロイド（１－４２）を認識するが、配列番号：１で表されるアミノ酸配列を有するβ－アミロイド（１－３８）、配列番号：２で表されるアミノ酸配列を有するβ－アミロイド（１－３９）および配列番号：３で表されるアミノ酸配列を有するβ－アミロイド（１－４０）を認識しない抗体である前記（１）記載の剤などを提供する。

発明を実施するための最良の形態

本発明で用いられる抗β－アミロイド抗体を産生するハイブリドーマ細胞のうち、ＢＡ－２７は平成４年１２月２２日から財団法人発酵研究所（ＩＦＯ）（大阪府大阪市淀川区十三本町２－１７－８５（郵便番号５３２－８６８６））にＩＦＯ　５０３８７として、平成５年１月７日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（ＮＩＢＨ）〔現、独立行政法人産業技術総合研究所　特許生物寄託センター（茨城県つくば市東１－１－１　中央第６（郵便番号３０５－８５６６））〕にＦＥＲＭ　ＢＰ－４１３９として寄託されている。

また、本発明で用いられる抗β－アミロイド抗体を産生するハイブリドーマ細胞のうち、ＢＣ－０５は平成５年１１月２日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（ＮＩＢＨ）〔現、独立行政法人産業技術総合研究所　特許生物寄託センター（茨城県つくば市東１－１－１　中央第６（郵便番号３０５－８５６６））〕にＦＥＲＭ　ＢＰ－４４５７として寄託されている。

なお、本明細書において、各ハイブリドーマ細胞から得られる抗体については、細胞名の後にａを付けた形で表記している。

本明細書において用いられる配列番号のうち、配列番号：１～配列番号：９は、以下のペプチドのアミノ酸配列を表す。

〔配列番号：１〕β－アミロイド（１－３８）
〔配列番号：２〕β－アミロイド（１－３９）
〔配列番号：３〕β－アミロイド（１－４０）

〔配列番号：4〕β－アミロイド（1－41）
〔配列番号：5〕β－アミロイド（1－42）
〔配列番号：6〕β－アミロイド（1－43）
〔配列番号：7〕β－アミロイド（1－28）
〔配列番号：8〕β－アミロイド（25－35）
〔配列番号：9〕β－アミロイド（35－43）

本明細書におけるタンパク質（ポリペプチド）は、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをはじめとする、本発明で用いられるタンパク質は、C末端がカルボキシル基、カルボキシレート、アミドまたはエステルの何れであってもよい。

本発明におけるβ－アミロイドとしては、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有するβ－アミロイド（1－38）、配列番号：2で表されるアミノ酸配列を有するβ－アミロイド（1－39）、配列番号：3で表されるアミノ酸配列を有するβ－アミロイド（1－40）、配列番号：4で表されるアミノ酸配列を有するβ－アミロイド（1－41）、配列番号：5で表されるアミノ酸配列を有するβ－アミロイド（1－42）または配列番号：6で表されるアミノ酸配列を有するβ－アミロイド（1－43）など（好ましくは、配列番号：5で表されるアミノ酸配列を有するβ－アミロイド（1－42）など）が用いられる。

本発明におけるβ－アミロイドの誘導体としては、上記β－アミロイドのN端部のアミノ酸がそれぞれ1ないし17残基程度欠落したもの、L－アスパラギン酸がL－イソアスパラギン酸、D－イソアスパラギン酸またはD－アスパラギン酸に異性化したもの、N端部にピログルタミン酸を有するもの、上記β－アミロイドのN端部から1番目～10番目のアミノ酸が欠如したアミノ酸配列を有するペプチドであってN端のグルタミン酸がピログルタミン酸に変換したものなどが用いられる。具体的には、配列番号：5で表されるアミノ酸配列の第2番目～42番目のアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号：5で表されるアミノ酸配列の第3番目～42番目のアミノ酸配列を有するペプチドであってN端のグルタミン酸がピログルタミン酸に変換したペプチド、配列番号：5で表されるアミノ酸

配列の第４番目～４２番目のアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号：１～配列番号：６で表されるアミノ酸配列から第１番目～１６番目のアミノ酸配列または第１番目～１７番目のアミノ酸配列が欠如したアミノ酸配列を有するペプチド（例えば、β－アミロイド（１７－４０）、β－アミロイド（１８－４０）など）などが用いられる。これらのβ－アミロイドまたはその誘導体は、例えばヒト、サル、ラット、マウスなどの哺乳動物より自体公知の方法で調製することもできるし、市販の天然精製標品であってもよい。また、合成ペプチドを用いてもよい。

本発明におけるβ－アミロイドまたはその誘導体のC端側の部分ペプチドとしては、例えばβ－アミロイドのN端のアミノ酸から数えて２５番目以降のアミノ酸配列を有する部分ペプチドが挙げられる。

上記したβ－アミロイドまたはその誘導体は、例えば、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸）や塩基（例、アルカリ金属塩）などとの塩（好ましくは生理学的に許容される酸付加塩）などとして用いてもよく、この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蓚酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

本発明におけるβ－アミロイドまたはその誘導体のC端側の部分ペプチドに特異的に反応するモノクローナル抗体（以下、単に抗体と称することがある）としては、例えばβ－アミロイドまたはその誘導体を認識するが、配列番号：７で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチド（すなわち、β－アミロイド（１－２８）で表されるβ－アミロイドのN端側の部分ペプチド）を認識しない抗体などが用いられる。また、β－アミロイドまたはその誘導体を認識するが、配列番号：８で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチド（すなわち、β－アミロイド（２５－３５）で表されるβ－アミロイドの中心部分の部分ペプチド）を認識しない抗体；β－アミロイドまたはその誘導体を認識するが、配列番号：９で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチド（すなわち、β－アミロイド（３５－４３）で表されるβ－アミロイドのC端側の部分ペプチド）を認識しない抗体など

であってもよい。より具体的には、これらの抗体の中でも、

(i) 配列番号：８および配列番号：９で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチド（すなわち、β－アミロイド（２５－３５）およびβ－アミロイド（３５－４３））を認識しない抗体、

(ii) 配列番号：８で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチド（すなわち、β－アミロイド（２５－３５））を認識しないが、配列番号：９で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチド（すなわち、β－アミロイド（３５－４３））を認識する抗体などが好ましい。

上記（i）の抗体の中でも、配列番号：１で表されるアミノ酸配列を有するβ－アミロイド（１－３８）、配列番号：２で表されるアミノ酸配列を有するβ－アミロイド（１－３９）および（または）配列番号：３で表されるアミノ酸配列を有するβ－アミロイド（１－４０）を特に認識する抗体が好ましく、さらには配列番号：１で表されるアミノ酸配列を有するβ－アミロイド（１－３８）、配列番号：２で表されるアミノ酸配列を有するβ－アミロイド（１－３９）、配列番号：３で表されるアミノ酸配列を有するβ－アミロイド（１－４０）を認識するが、配列番号：５で表されるアミノ酸配列を有するβ－アミロイド（１－４２）を認識しない抗体が好ましい。

また、上記（ii）の抗体の中でも、アルツハイマー病患者の脳ギ酸抽出物中に含まれるβ－アミロイド（特に、配列番号：５で表されるアミノ酸配列を有するβ－アミロイド（１－４２））を特に認識する抗体が好ましく、さらには配列番号：５で表されるアミノ酸配列を有するβ－アミロイド（１－４２）を認識するが、配列番号：１で表されるアミノ酸配列を有するβ－アミロイド（１－３８）、配列番号：２で表されるアミノ酸配列を有するβ－アミロイド（１－３９）および配列番号：３で表されるアミノ酸配列を有するβ－アミロイド（１－４０）を認識しない抗体が好ましい。

上記（i）の抗体の代表例としては、ＢＡ－２７ａで標示されるモノクローナル抗体（WO 94/17197号公報参照）があり、上記（ii）の抗体の代表例としては、ＢＣ－０５ａ、ＢＣ－１５ａ、ＢＣ－６５ａ、ＢＣ－７５ａ、ＢＣ－５５ａ（特に、ＢＣ－０５ａが好ましい）で標示されるモノクローナル抗体（WO

94/17197号公報参照）がある。

抗体の抗原の調製法、および抗体の製造法については、自体公知の方法、例えば、WO 94/17197号公報に記載の方法やそれに準ずる方法を用いることができるが、以下に、その例を示す。

（１）抗原の調製

本発明の抗体を調製するために使用される抗原としては、例えばβ－アミロイドまたはその誘導体、β－アミロイドまたはその誘導体を加水分解して得られる部分ペプチド、β－アミロイドと同一の抗原決定基を１種あるいは２種以上有する合成ペプチドなど何れのものも使用することができる（以下、これらを単にβ－アミロイド抗原と称することもある）。該β－アミロイドまたはその誘導体としては、前述したものが用いられる。これらβ－アミロイドまたはその誘導体は、例えばヒト、サル、ラット、マウスなどの哺乳動物から自体公知の方法あるいはそれに準ずる方法を用いて調製することもできるし、また市販の天然精製標品であってもよい。また、合成ペプチドを用いてもよい。

前記β－アミロイドまたはその誘導体またはそれらの塩は、公知の方法、例えばWO 02/06483号公報に記載の方法に準じて製造でき、さらに、(a) 例えばヒト、サル、ラット、マウスなどの哺乳動物の組織または細胞から公知の方法あるいはそれに準ずる方法を用いて調製、(b) ペプチド・シンセサイザー等を使用する公知のペプチド合成方法で化学的に合成、(c) 所望のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造される。

(a) 該哺乳動物の組織または細胞からβ－アミロイド抗原を調製する場合、その組織または細胞をホモジナイズした後、酸、またはアルコールなどで抽出を行い、該抽出液を、塩析、透析、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせることにより精製単離することができる。

(b) 化学的にβ－アミロイド抗原を調製する場合、該合成ペプチドとしては、例えば上述した天然より精製したβ－アミロイド抗原と同一の構造を有するもの、などが用いられる。

(c) DNAを含有する形質転換体を用いて所望のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩を製造する場合、該DNAは、公知のクローニング方法〔例えば、Molecular Cloning (2nd ed. ; J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法など〕に従って作製することができる。該クローニング方法とは、(1) 所望のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩のアミノ酸配列に基づきデザインしたDNAプローブまたはDNAプライマーを用い、cDNAライブラリーからハイブリダイゼーション法により所望のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩をコードするDNAを含有する形質転換体を得る方法、または（２）所望のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩のアミノ酸配列に基づきデザインしたDNAプライマーを用い、PCR法により所望のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩をコードするDNAを含有する形質転換体を得る方法などが挙げられる。

該β－アミロイドを加水分解して得られる部分ペプチドとしては、例えば配列番号：６で表されるアミノ酸配列を有するβ－アミロイド（１－４３）などをアミノペプチダーゼやカルボキシペプチダーゼなどのエキソプロテアーゼによりＮ末端および（または）Ｃ末端から順次加水分解して得られる部分ペプチドまたはそれらの混合物、あるいはβ－アミロイド（１－４３）を種々のエンドペプチダーゼにより加水分解して得られる部分ペプチドまたはそれらの混合物などが用いられる。この方法でβ－アミロイド（１－４２）を作製した場合、標品中にβ－アミロイド（１－４１）および（または）β－アミロイド（１－４３）が混合している場合がある。該合成ペプチドとしては、例えば上述した天然より精製したβ－アミロイド抗原と同一の構造を有するものや、β－アミロイド（１－４３）などのアミノ酸配列において３個以上、好ましくは６個以上のアミノ酸からなる任意の箇所のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を１種あるいは２種以上含有するペプチド（以下β－アミロイド関連合成ペプチドと略す）などが用いられる。

上記合成ペプチドは、公知の常套手段で製造することができ、固相合成法、液相合成法のいずれによっても製造することができる。すなわち、該ペプチドを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護

基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。具体的な、公知の縮合方法や保護基の脱離方法としては、例えばB. Merrifield〔ジャーナル　オブ　アメリカン　ケミカル　ソサイェティ（J. Am. Chem. Soc.）,85. 2149(1963)〕、M. BodanszkyおよびM. A. Ondetti〔ペプチド　シンセーシス（Peptide Synthesis），Interscience Publishers, New York,1966年〕、SchroderおよびLubke〔ザ　ペプチド（The Peptide），Academic Press，New York, 1965年〕、泉屋信夫他〔ペプチド合成の基礎と実験、丸善、1985年〕、矢島治明および榊原俊平〔生化学実験講座１、タンパク質の化学IV, 205,1977年〕などが用いられる。例えば、固相法によりβ－アミロイドあるいはβ－アミロイド関連合成ペプチドを合成する場合には、不溶性樹脂として当該技術分野で知られたもの（例えば、クロロメチル樹脂、４－オキシメチルフェニルアセタミドメチル樹脂など）の何れかの樹脂を用い、β－アミロイドあるいはβ－アミロイド関連合成ペプチドのＣ末端側から保護アミノ酸を常法に従って順次縮合する。次いで、フッ化水素処理で全保護基を除去して、高速液体クロマトグラフィーなどのそれ自体公知の方法による精製後、目的とするβ－アミロイドあるいはβ－アミロイド関連合成ペプチドを得ることができる。また、Ｎ－保護アミノ酸としては、α－アミノ基はＢｏｃ基で保護し、さらに例えばセリンおよびスレオニンの水酸基はＢｚｌ基で保護し、グルタミン酸、アスパラギン酸のω－カルボキシル基はＯＢｚｌ基で保護し、リジンのε－アミノ基はＣｌ－Ｚ基で保護し、チロシンの水酸基はＢｒ－Ｚ基で保護し、アルギニンのグアニド基はＴｏｓ基で保護し、ヒスチジンのイミダゾール基はＢｏｍ基で保護する方法で製造することができる。また、反応後は通常の精製法、例えば、溶媒抽出、蒸留、カラムクロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、再結晶などを組み合わせて該ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られるペプチドが遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。

ペプチドのアミド体は、アミド形成に適した市販のペプチド合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、４－ベンジルオ

キシベンジルアルコール樹脂、４－メチルベンズヒドリルアミン樹脂、ＰAM樹脂、４－ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、４－（２’，４’－ジメトキシフェニル－ヒドロキシメチル）フェノキシ樹脂、４－（２’，４’－ジメトキシフェニル－Ｆｍｏｃアミノエチル）フェノキシ樹脂などを挙げることができる。このような樹脂を用い、α－アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするペプチドの配列通りに、公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からペプチドを切り出すと同時に各種保護基を除去し、目的のペプチドを取得する。あるいはクロロトリチル樹脂、オキシム樹脂、４－ヒドロキシ安息香酸系樹脂等を用い、部分的に保護したペプチドを取り出し、更に常套手段で保護基を除去し目的のペプチドを得ることもできる。

上記した保護されたアミノ酸の縮合に関しては、ペプチド合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としてはＤＣＣ、Ｎ，N'－ジイソプロピルカルボジイミド、Ｎ－エチル－Ｎ’－（３－ジメチルアミノプロリル）カルボジイミドなどが挙げられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤（例えば、ＨＯＢｔ、ＨＯＯＢｔなど）とともに保護されたアミノ酸を直接樹脂に添加するか、または、対称酸無水物またはＨＯＢｔエステルあるいはＨＯＯＢｔエステルとしてあらかじめ保護されたアミノ酸の活性化を行ったのちに樹脂に添加することができる。保護されたアミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、ペプチド縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。たとえばＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド、Ｎ，Ｎ－ジメチルアセトアミド、Ｎ－メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジンなどの三級アミン類、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度はペプチド結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約－２０℃～約５０℃の範囲から適宜選択される。活

性化されたアミノ酸誘導体は通常約１．５ないし約４倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行うことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行うことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化して、後の反応に影響を及ぼさないようにすることができる。

原料アミノ酸のアミノ基の保護基としては、たとえば、Ｚ、Ｂｏｃ、ターシャリーペンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、４－メトキシベンジルオキシカルボニル、Ｃｌ－Ｚ、Ｂｒ－Ｚ、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、２－ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Ｆｍｏｃなどが挙げられる。カルボキシル基の保護基としては、たとえばC_{1-6}アルキル基、C_{3-8}シクロアルキル基、C_{7-14}アラルキル基、２－アダマンチル、４－ニトロベンジル、４－メトキシベンジル、４－クロロベンジル、フェナシルおよびベンジルオキシカルボニルヒドラジド、ターシャリーブトキシカルボニルヒドラジド、トリチルヒドラジドなどが挙げられる。

セリンおよびスレオニンの水酸基は、たとえばエステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては例えばアセチル基などの低級（C_{1-6}）アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが挙げられる。また、エーテル化に適する基としては、たとえばベンジル基、テトラヒドロピラニル基、t-ブチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、たとえばＢｚｌ、Ｃｌ－Ｂｚｌ，２－ニトロベンジル、Ｂｒ－Ｚ、t-ブチルなどが挙げられる。

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、Ｔｏｓ、４－メトキシ－２，３，６－トリメチルベンゼンスルホニル、ＤＮＰ、Ｂｏｍ、Ｂｕｍ、Ｂｏｃ、Ｔｒｔ、Ｆｍｏｃなどが挙げられる。

原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、たとえば対応する酸無水物、アジド、活性エステル［アルコール（たとえば、ペンタクロロフェノール、

２，４，５－トリクロロフェノール、２，４－ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、ＨＯＮＢ、Ｎ－ヒドロキシスクシミド、Ｎ－ヒドロキシフタルイミド、ＨＯＢｔ）とのエステル〕などが挙げられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、たとえば対応するリン酸アミドが挙げられる。

保護基の除去（脱離）方法としては、たとえばＰｄ－黒あるいはＰｄ－炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども挙げられる。上記酸処理による脱離反応は一般に－２０℃～４０℃の温度で行われるが、酸処理においてはアニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、１，４－ブタンジチオール、１，２－エタンジチオールのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる２，４－ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の１，２－エタンジチオール、１，４－ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護および保護基、ならびにその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基あるいは公知の手段から適宜選択しうる。

ペプチドのアミド体を得る別の方法としては、まず、カルボキシル末端アミノ酸のα－カルボキシル基をアミド化した後、アミノ基側にペプチド鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のＮ末端のα－アミノ基の保護基のみを除いたペプチドとＣ末端のカルボキシル基の保護基のみを除いたペプチド（またはアミノ酸）とを製造し、この両ペプチドを上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護ペプチドを精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗ペプチドを得

ることができる。この粗ペプチドは既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のペプチドのアミド体を得ることができる。

ペプチドのエステル体を得るにはカルボキシ末端アミノ酸のα－カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、ペプチドのアミド体と同様にして所望のペプチドのエステル体を得ることができる。

β－アミロイド抗原は、凝集しやすいため、不溶化したものを直接免疫することもできる。また、該β－アミロイド抗原を適当な担体に結合または吸着させた複合体を免疫してもよい。該担体および担体（キャリアー）とβ－アミロイド抗原（ハプテン）との混合比は、担体に結合あるいは吸着させたβ－アミロイド抗原に対して抗体が効率よくできれば、どのようなものをどのような比率で結合あるいは吸着させてもよく、通常ハプテン抗原に対する抗体の作製にあたり常用されている天然もしくは合成の高分子担体を重量比でハプテン１に対し０．１～１００の割合で結合あるいは吸着させたものを使用することができる。天然の高分子担体としては、例えばウシ、ウサギ、ヒトなどの哺乳動物の血清アルブミンや例えばウシ、ウサギなどの哺乳動物のチログロブリン、例えばウシ、ウサギ、ヒト、ヒツジなどの哺乳動物のヘモグロビン、キーホールリンペットヘモシアニンなどが用いられる。合成の高分子担体としては、例えばポリアミノ酸類、ポリスチレン類、ポリアクリル類、ポリビニル類、ポリプロピレン類などの重合物または供重合物などの各種ラテックスなどを用いることができる。

また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤を用いることができる。例えば、チロシン、ヒスチジン、トリプトファンを架橋するビスジアゾ化ベンジジンなどのジアゾニウム化合物、アミノ基同志を架橋するグルタルアルデビトなどのジアルデヒド化合物、トルエン－２，４－ジイソシアネートなどのジイソシアネート化合物、チオール基同志を架橋するN，N’－ｏ－フェニレンジマレイミドなどのジマレイミド化合物、アミノ基とチオール基を架橋するマレイミド活性エステル化合物、アミノ基とカルボキシル基とを架橋するカルボジイミド化合物などが好都合に用いられる。また、アミノ基同志を架橋する際にも、一方のアミノ基にジチオピリジル基を有する活性エステル試薬（例えば、3-(2-ピリジルジチオ)プロピオン酸N-スクシンイミジル（SPDP）など）を反応させ

た後還元することによりチオール基を導入し、他方のアミノ基にマレイミド活性エステル試薬によりマレイミド基を導入後、両者を反応させることもできる。

（２）モノクローナル抗体の作製

β－アミロイド抗原は、温血動物に対して、例えば腹腔内注入、静脈注入、皮下注射などの投与方法によって、抗体産生が可能な部位にそれ自体単独であるいは担体、希釈剤と共に投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常２～６週毎に１回ずつ、計２～１０回程度行われる。温血動物としては、例えばサル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリなどがあげられるが、モノクローナル抗体作製にはマウス、ラットなどが好ましく用いられる。

モノクローナル抗体の作製に際しては、β－アミロイド抗原を免疫された温血動物、たとえばマウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の２～５日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髄腫細胞と融合させることにより、抗β－アミロイドモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。血清中の抗β－アミロイド抗体価の測定は、例えば後記の標識化β－アミロイドと抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することによりなされる。融合操作は既知の方法、例えばケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー（Nature）、２５６、４９５　（１９７５）〕に従い実施できる。融合促進剤としては、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）やセンダイウィルスなどが挙げられるが、好ましくはＰＥＧなどが用いられる。骨髄腫細胞としてはたとえばＮＳ－１、Ｐ３Ｕ１、ＳＰ２／０、ＡＰ－１などがあげられるが、Ｐ３Ｕ１などが好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞（脾臓細胞）数と骨髄細胞数との好ましい比率は、通常１：１～２０：１程度であり、ＰＥＧ（好ましくはＰＥＧ１０００～ＰＥＧ６０００）が１０～８０％程度の濃度で添加され、通常２０～４０℃、好ましくは３０～３７℃で通常１～１０分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

抗β－アミロイド抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えばβ－アミロイドあるいはβ－アミロイド関連合成ペプタイ

ドを直接あるいは担体とともに吸着させた固相（例、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）またはプロテインＡを加え、固相に結合した抗β－アミロイドモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインＡを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したβ－アミロイドを加え、固相に結合した抗β－アミロイドモノクローナル抗体を検出する方法などがあげられる。抗β－アミロイドモノクローナル抗体の選別、育種は通常ＨＡＴ（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加して、１０～２０％牛胎児血清を含む動物細胞用培地（例、ＲＰＭＩ１６４０）で行われる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗β－アミロイド抗体価の測定と同様にして測定できる。

抗β－アミロイドモノクローナル抗体の分離精製は、通常のポリクローナル抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例、ＤＥＡＥ）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテインＡ、プロテインＧあるいはＫＡＰＴＩＶ－ＡＥ（TECNOGEN S.C.P.A.社）などの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法など〕に従って行われる。

また、β－アミロイドの一部領域と反応する抗β－アミロイド抗体を産生するハイブリドーマ、および、β－アミロイドとは反応するがその一部領域とは反応しない抗β－アミロイドモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの選別は、たとえばその一部領域に相当するペプチドとハイブリドーマが産生する抗体との結合性を測定することにより行うことができる。

以上のようにして、ハイブリドーマ細胞を温血動物の生体内又は生体外で培養し、その体液または培養物から抗体を採取することによって、本発明の抗体を製造することができる。

このようにして得られる抗β－アミロイドモノクローナル抗体は、アルツハイマー病、軽度認知障害（ＭＣＩ）、脳アミロイドアンギオパチー（ＣＡＡ）など

（好ましくは、アルツハイマー病など）の予防・治療剤（進展抑制剤も含む）として使用することができる。また、該予防・治療剤としては、β－アミロイドの脳内での凝集または沈着の抑制剤、配列番号：５で表されるアミノ酸配列を有するペプチドの血中濃度の特異的な上昇剤などであることが好ましい。

これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また抗体分子の$F(ab')_2$、Fab'またはFab画分などを用いてもよい。また、これらの目的に用いられる本発明の抗体としては、脳血液関門（ＢＢＢ）を透過する抗体が好ましく、なかでも、β－アミロイドの沈着を抑制する抗体、β－アミロイドのオリゴマー形成を阻害する抗体、あるいは形成された老人斑からβ－アミロイドを引き抜きうる抗体（あるいは脳内に形成された老人斑を消失させうる抗体）などが好ましい。あるいは、脳血液関門（ＢＢＢ）を透過しない抗体であってもよく、この場合は、末梢中のβ－アミロイドを末梢で捕捉し、脳内から末梢へのβ－アミロイドの排出を促進しうる抗体であることが好ましい。

また、上記のように脳血液関門（ＢＢＢ）を透過し、形成された老人斑のβ－アミロイドと結合しうる抗体は、アルツハイマー病、軽度認知障害（ＭＣＩ）などの体内での直接的な診断剤として用いることもできる。ごく初期のアルツハイマー病、軽度認知障害（ＭＣＩ）に見られるびまん性老人斑は、β－アミロイド（ｘ－４２）を主な構成成分とすることが知られているため、特にβ－アミロイド（ｘ－４２）のＣ端部に特異的な抗体、抗体分子の$F(ab')_2$、Fab'またはFab画分などとびまん性老人斑との、体内での直接的な結合を高磁場ＭＲＩなどを用いて画像化することにより、これまで困難であったアルツハイマー病や軽度認知障害（ＭＣＩ）の早期診断が可能になると考えられる。

本発明の抗体を含有するアルツハイマー病、軽度認知障害（ＭＣＩ）、脳アミロイドアンギオパチー（ＣＡＡ）など（好ましくは、アルツハイマー病など）の予防・治療剤は低毒性であり、そのまま液剤として、または適当な剤型の医薬組成物として、ヒトまたは哺乳動物（例、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して経口的または非経口的に投与することができる。投与量は、投与対象、対象疾患、症状、投与ルートなどによっても異なるが、例えば、成人のアルツハイマー病の治療のために使用する場合には、本発明の抗

体を１回量として、通常0.01～20mg/kg体重程度、好ましくは0.1～10mg/kg体重程度、さらに好ましくは0.1～5mg/kg体重程度を、1週間に1～5回程度、好ましくは1ヶ月に1～4回程度、非経口投与するのが好都合である。経口投与の場合もこれに準ずる量を投与することができる。症状が特に重い場合には、その症状に応じて増量してもよい。

本発明の抗体は、それ自体または適当な医薬組成物として投与することができる。上記投与に用いられる医薬組成物は、上記抗体またはその塩と薬理学的に許容され得る担体、希釈剤もしくは賦形剤とを含むものである。かかる組成物は、経口または非経口投与に適する剤形として提供される。

例えば、経口投与のための組成物としては、固体または液体の剤形、具体的には錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む）、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤（ソフトカプセル剤を含む）、シロップ剤、乳剤、懸濁剤等があげられる。かかる組成物は自体公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤もしくは賦形剤を含有するものである。例えば、錠剤用の担体、賦形剤としては、乳糖、でんぷん、蔗糖、ステアリン酸マグネシウム等が用いられる。

非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、坐剤等が用いられ、注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤等の剤形を包含する。かかる注射剤は、自体公知の方法に従って、例えば、上記抗体またはその塩を通常注射剤に用いられる無菌の水性もしくは油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製する。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液等が用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン界面活性剤〔例、ポリソルベート８０、ＨＣＯ－５０（polyoxyethylene（50mol）adduct of hydrogenated castor oil）〕等と併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油等が用いられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコール等を併用してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。直腸投与に用いられる坐剤は、上記抗体またはその塩を通常の坐薬用基剤に混合する

ことによって調製される。

上記の経口用または非経口用医薬組成物は、活性成分の投与量に適合するような投薬単位の剤形に調製されることが好都合である。かかる投薬単位の剤形としては、錠剤、丸剤、カプセル剤、注射剤（アンプル）、坐剤等が例示され、それぞれの投薬単位剤形当たり通常約5～500mg、とりわけ注射剤では約5～100mg、その他の剤形では約10～250mgの上記抗体が含有されていることが好ましい。

なお前記した各組成物は、上記抗体との配合により好ましくない相互作用を生じない限り他の活性成分を含有してもよい。

本発明の明細書において、アミノ酸等を略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commision on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。アミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければＬ体を示すものとする。

ＰＡＭ　：フェニルアセタミドメチル
Ｂｏｃ　：ｔ－ブチルオキシカルボニル
Ｚ　：ベンジルオキシカルボニル
Ｃｌ－Ｚ　：２－クロロ－ベンジルオキシカルボニル
Ｂｒ－Ｚ　：２－ブロモ－ベンジルオキシカルボニル
Ｂｚｌ　：ベンジル
ＯｃＨｅｘ：シクロヘキシルエステル
ＯＢｚｌ　：ベンジルエステル
Ｔｏｓ　：ｐ－トルエンスルホニル
ＨＯＢｔ　：１－ベンゾトリアゾール
ＭｅＢｚｌ：４－メチルベンジル
Ｂｏｍ　：ベンジルオキシメチル
ＤＣＣ　：Ｎ，Ｎ’－ジシクロヘキシルカルボジイミド
ＴＦＡ　：トリフルオロ酢酸
ＤＭＦ　：N,N－ジメチルフォルムアミド
Ｇｌｙ　：グリシン

Ala :アラニン
Val :バリン
Leu :ロイシン
Ile :イソロイシン
Ser :セリン
Thr :スレオニン
Cys :システイン
Met :メチオニン
Glu :グルタミン酸
Asp :アスパラギン酸
Lys :リジン
Arg :アルギニン
His :ヒスチジン
Phe :フェニルアラニン
Tyr :チロシン
Trp :トリプトファン
Pro :プロリン
Asn :アスパラギン
Gln :グルタミン
SPDP :3-(2-ピリジルジチオ)プロピオン酸N-スクシンイミジル
GMBS :N-(4-マレイミドブチリルオキシ)スクシンイミド
BSA :ウシ血清アルブミン
BTG :ウシチログロブリン
EIA :エンザイムイムノアッセイ
HPLC :逆相高速液体クロマトグラフィー
HRP :西洋ワサビパーオキシダーゼ
FBS :ウシ胎児血清
d-FBS :透析済みウシ胎児血清
TMB :3,3',5,5'-テトラメチルベンチジン

Ｈ／ＨＢＳＳ：ヘペスバッファードハンクスバランス溶液

本明細書において用いられる配列番号は、以下のペプチドのアミノ酸配列を表す。

〔配列番号：１〕β－アミロイド（１－３８）
〔配列番号：２〕β－アミロイド（１－３９）
〔配列番号：３〕β－アミロイド（１－４０）
〔配列番号：４〕β－アミロイド（１－４１）
〔配列番号：５〕β－アミロイド（１－４２）
〔配列番号：６〕β－アミロイド（１－４３）
〔配列番号：７〕β－アミロイド（１－２８）
〔配列番号：８〕β－アミロイド（２５－３５）
〔配列番号：９〕β－アミロイド（３５－４３）

以下に、実施例を示し、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

実施例で用いたモノクローナル抗体ＢＣ－０５ａおよびＢＡ－２７ａは、WO 94/17197号公報の実施例７に記載の方法に従って得た。

実施例１

（１）サンドイッチ法-EIAによるＡβx-40、Ａβx-42の測定

マウスモノクローナル抗体BNT-77a（Asami-Odaka A. et al., Biochemistry, 34巻, 10272-10278頁, 1995年）は、WO 94/17197号公報の実施例７に記載の方法に準じ、β－アミロイド(11-28)をBALB/Cマウスに免疫することにより得た。これを15μg/ml含む0.1M 炭酸緩衝液、pH9.6溶液を96ウェルマイクロプレートに100μlずつ分注し、4℃で24時間放置した。ウェルの余剰の結合部位を、PBSで4倍希釈したブロックエース（大日本製薬）300μlを加え、4℃で24時間放置することにより不活化した。Ａβx-40の測定は、上記のように1次抗体を固定化したプレートに、バッファーEC〔10％ブロックエース、0.2％ BSA、0.4M NaCl、0.05％ CHAPS、2mM EDTA、0.05％ NaN_3を含む0.02Mリン酸緩衝

液、pH7〕で希釈したAβ1-40（ペプチド研究所）の希釈系列および被験試料100μlを加え、4℃で24時間反応させた。PBSで洗浄したのち、2次抗体としてバッファーC〔1% BSA、0.4M NaCl、および2mM EDTAを含む0.02M リン酸緩衝液、pH7〕で1000倍に希釈したBA-27a-HRP（WO 94/17197号公報参照）を100μl加え、室温で6時間反応させた。PBSで洗浄した後、TMBマイクロウェルパーオキシダーゼ基質システム（KIRKEGAARD & PERRY LAB, INC）100μlを加え室温で10分間反応させた。反応を1M リン酸100μlを加えることにより停止させた後、450nmの吸光度をプレートリーダー（SPECTRAMAX190、Molecular Device社）で測定することにより固相上の酵素活性を求めた。Aβx-42の測定は、上記で作製したBNT-77a固定化プレートにAβ1-42（ペプチド研究所）の希釈系列および被験試料を加え、2次抗体としてBC-05a-HRP（WO 94/17197号公報参照）を用いることにより、Aβx-40と同様に測定した。

（２）BA-27aまたはBC-05aの腹腔内投与後のBALB/Cマウス血漿および脳脊髄液中のAβx-40およびAβx-42の濃度変化

3ヶ月齢、BALB/Cマウス19匹で上記抗体の効果を検討した。0.5mgのBA-27aと0.5mgのBC-05aをそれぞれ7匹と6匹のマウスの腹腔に投与した。残りの非投与6匹をコントロールとして検討した。投与後16時間後に、エーテル麻酔下で、マウスから血漿(plasma)と脳脊髄液(CSF)を採取し、Aβx-40とAβx-42を計測した。さらに1週間おきに4回、BC-05aを腹腔投与したマウスの血漿を採取し、Aβx-42を測定した。このうちの血漿10μlと5μgのDynabeads M280 anti-mouse Ig (Dynal)を2時間室温で反応させた後に上清を回収し、血漿中の免疫グロブリン非結合型Aβx-40とAβx-42および0.2M Glycine pH2.8で溶出した免疫グロブリン結合型をAβx-40とAβx-42を測定した。

血漿Aβx-40は、BA-27a投与群では137.3±2.2fmol/ml、BC-O5a投与群では3.3±1.2fmol/ml、正常対照群では3.4±1.8fmol/mlであった。

脳脊髄液Aβx-40は、BA-27a投与群では670.8±252.6fmol/ml、BC-O5a投与群では166.5±140.1fmol/ml，正常対照群では246±184.3fmol/mlであった。血漿Aβx-42は、BA-27a投与群では0.5±0.4fmol/ml、BC-O5a投与群では60.7±7.1fmol/ml、正常対照群では0.2±0.2fmol/mlであった。

脳脊髄液Aβx-42は、BA-27a投与群では測定感度以下、BC-O5a投与群では0.6±0.4fmol/ml、正常対照群では測定感度以下であった。

Aβx-40は、BA-27a投与によって血漿で40倍、脳脊髄液で2.7倍と有意に上昇した($p<0.001$)。BC-05a投与では血漿および脳脊髄液ともにAβx-40の上昇はみられなかった。

Aβx-42は、BA-27a投与では血漿および脳脊髄液ともにAβx-42の上昇はみられなかった。BC-05a投与では血漿で304倍と有意に上昇し($p<0.001$)、脳脊髄液では正常対照では測定感度以下であったものが、0.6±0.4fmol/mlと上昇した。

BC-05aを一ヶ月間、継続投与したマウスでは、血漿Aβx-42のみ324.1fmol/mlと1621倍に増加しており、しかも、抗体結合型、抗体非結合型に免疫沈降法で分けて測定すると、増加したAβx-42のほぼ100%が抗体非結合型であった。

以上の結果は、抗Aβ42C末端特異抗体BC-05aをマウス腹腔に投与すると、脳脊髄液Aβx-42と血漿Aβx-42を特異的にしかも著明に上昇させることを示している。血漿中に上昇したAβx-42は免疫グロブリン非結合型であることから、このAβx-42の上昇は、投与したBC-05aが血液中で結合しているAβx-42を測定したものではない。

したがって、投与されたBC-05aは脳内Aβx-42のクリアランスを特異的に増加させて、脳脊髄液Aβx-42と血漿Aβx-42の増加を来したものと考えられる。

この結果はBC-05aを投与することにより、アルツハイマー病の発病開始因子であるAβx-42の脳内濃度を選択的に制御できること、さらに一度沈着して様々な病理過程を引き起こしている脳アミロイドAβx-42の沈着を選択的に解除し、改善しうることを示している。投与されたBC-05aが脳内のAβx-42と結合することを応用すれば、老人斑の選択的画像化やBC-05aの血管内投与による脳アミロイドAβx-42沈着量の選択的推定などの新たな診断法への応用も可能と考えられる。

実施例２

（１）ビオチン化BC-05aおよびビオチン化マウスIgGの作製

BC-05a (10 mg/ml) 2 mlにsulfo-NHS-biotin（Pierce社）水溶液（2.4 mg/120 μl）40μlを添加し、攪拌しながら室温で30分間反応させた。反応液を希釈し4℃で2日間、PBS(-)に対して透析した後、抗体濃度を測定した。収率約70%。対照に用いるマウスIgG（和光純薬）も同様にビオチン化した。

（２）若齢APPswTg（Tg2576）マウスへのビオチン化抗体の短期連投、大脳可溶性画分の調製と脳内抗体濃度の測定

雌性Tg2576マウス（12週齢）（Science, 274巻, 99-102頁, 1996年）に対し、ビオチン化マウスIgGまたはビオチン化BC-05a（各0.5 mg/0.2 ml/マウス）を単回腹腔内投与し、24時間後に採血、灌流後大脳を採取、半切後凍結した(n=4-5)。血液にはプロテアーゼインヒビターカクテル（Complete、Roche社）とEDTA（終濃度4 mg/ml）を加えて混和し、遠心後の上清を血漿として凍結保存した。プロテアーゼインヒビターカクテルを含む50 mM トリス塩酸含有生理食塩水（pH 7.5）（TSバッファー）を、大脳半球に重量の4倍量加えてホモジナイズし、300,000 x g、4℃で20分間超遠心した後の上清を大脳可溶性画分とした。これをアビジン固定化96ウェルプレート（Reacti-Bind NeutrAvidin Coated Plate, Pierce社）に添加し4℃で一晩反応させた。洗浄後、抗マウスIgG-HRP (Amersham社)を加えて室温で6時間反応させ、洗浄後HRPの基質（TMB Microwell Peroxidase substrate system, KPL社）を加えた。1M 燐酸で反応停止後、プレートリーダーで450 nmの吸光度を測定し、付属の計算ソフト（SoftMAX）で脳内抗体濃度を算出した。血漿中の抗体濃度も同様に測定した。BC-05aを標品とすることにより得た検量線を作製し、上記（１）で得られたビオチン化BC-05aの血漿および脳内の濃度結果を表１に示す。

〔表１〕

	ビオチン化マウスIgG投与群 (n＝4) (pmol/g wet tissue)	ビオチン化BC-05a投与群 (n＝5) (pmol/g wet tissue)
血漿	1300±296	1030±94.8
大脳可溶性画分	6.42±0.475	4.75±0.056

mean ± S.E.M.

これより、ビオチン化BC-05aおよびビオチン化IgGのいずれを投与した場合でも、血漿の抗体濃度の0.5%前後が脳内に移行していることがわかる。

実施例３

若齢APPswTg（Tg2576）マウスへのBC-05a 9ヶ月間連投、大脳抽出物の調製と血中・脳内Aβ濃度の定量

雄性Tg2576マウス（10週齢）（Science, 274巻, 99-102頁, 1996年）に対し、マウスIgGまたはBC-05a（15週齢まで各0.5 mg/0.2 ml/マウス、16週齢以降各1.0 mg/0.2 ml/マウス）を週1回、52週齢（12ヶ月齢）まで腹腔内投与した(n=9-10)。サンプリングは上記と同様の方法で行った。

大脳抽出物は可溶性画分と不溶性画分に分けて調製した。可溶性画分は実施例２と同様に調製し、超遠心後の沈殿をTSバッファーで洗った後、大脳半球重量の8倍量の6 M グアニジン塩酸含有50 mM トリス塩酸水溶液（pH7.5）を加え、溶解させた。15000rpm、4℃で20分間遠心し、その上清を不溶性画分とした。Aβ濃度の測定は実施例１記載の方法に従った。大脳不溶性画分はバッファーECで2000倍希釈したものをサンプルとした。

血漿中のAβ濃度は、希釈した血漿をそのまま定量する方法と、グアニジン塩酸でBC-05a複合体を解離させたのち、希釈したものを定量する方法の二通りで求めた。後者は、血漿10μlに8 M グアニジン塩酸含有50 mM トリス塩酸水溶液（pH7.5）30μlを加え、混和した後バッファーEC 560μlを加えて希釈したものをELISAのサンプルとした。

結果を表２に示す。

〔表２〕

	Aβx-40 (pmol/g wet tissue)	Aβx-42 (pmol/g wet tissue)

血漿（処理なし）	IgG投与群	3160 ± 302	389 ± 20.0
	BC-05a投与群	2270 ± 186	8810 ± 224
血漿（ｸﾞｱﾆｼﾞﾝ処理）	IgG投与群	2990 ± 208	588 ± 29.0
	BC-05a投与群	2350 ± 128	18800 ± 1100
大脳可溶性Aβ	IgG投与群	2.23 ± 0.402	0.413 ± 0.0521
	BC-05a投与群	2.29 ± 0.27	0.643 ± 0.0687
大脳不溶性Aβ	IgG投与群	1650 ± 383	645 ± 102
	BC-05a投与群	1200 ± 347	442 ± 57.4

mean ± S.E.M.

単回投与と同様、血漿のAβ濃度はBC-05a投与により22倍から32倍に大きく上昇した。血漿をグアニジンで処理することにより、BC-05a投与群の血漿Aβx-42濃度はさらに2倍程度上昇したことから、BC-05aは血中でのAβx-42の安定化に寄与している可能性が考えられる。

脳内可溶性Aβx-40濃度に変化は見られなかったが、不溶性Aβx-40濃度は減少傾向を示した。脳内Aβx-42濃度は可溶性画分で有意に上昇し、不溶性画分で減少傾向を示した。

産業上の利用可能性

β－アミロイドまたはその誘導体のＣ端側の部分ペプチドに特異的に反応し、かつ配列番号：８で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識しないモノクローナル抗体を用いることによって、Ｃ端部疎水的領域を有するβ－アミロイドを特異的に認識することができ、この抗体はアルツハイマー病などの予防・治療剤あるいは診断剤などとして有用である。さらに、β－アミロイド（ｘ－４２）は脳脊髄液などの可溶性画分における比率が低いため、脳血液関門を介する脳外への運び出しは効率が低いと予想されるにもかかわらず、上記抗体は、β－アミロイド（ｘ－４２）のみの血液中濃度を選択的に増加させ、脳内不溶性β－アミロイド（ｘ－４２）を低下させる可能性がある。また、上記抗体は、β－アミロイド（ｘ－４０）を主な構成成分とする脳血管アミロイドに対してほとんど

反応しないため、脳アミロイドアンギオパチーを含む脳血管からの出血を惹起しないと考えられる。

請求の範囲

１．β－アミロイドまたはその誘導体のＣ端側の部分ペプチドに特異的に反応し、かつ配列番号：８で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識しないモノクローナル抗体を含有してなるアルツハイマー病、軽度認知障害または脳アミロイドアンギオパチーの予防・治療剤。

２．アルツハイマー病の予防・治療剤である請求項１記載の剤。

３．抗体が配列番号：９で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識しない抗体である請求項１記載の剤。

４．抗体が配列番号：９で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識する抗体である請求項１記載の剤。

５．β－アミロイドが配列番号：１、配列番号：２、配列番号：３、配列番号：４、配列番号：５または配列番号：６で表されるアミノ酸配列を有するペプチドである請求項１記載の剤。

６．β－アミロイドが配列番号：５で表されるアミノ酸配列を有するペプチドである請求項１記載の剤。

７．β－アミロイドの誘導体が、配列番号：５で表されるアミノ酸配列の２番目～４２番目のアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号：５で表されるアミノ酸配列の３番目～４２番目のアミノ酸配列を有するペプチドであってＮ端のグルタミン酸がピログルタミン酸に変換したペプチド、または配列番号：５で表されるアミノ酸配列の４番目～４２番目のアミノ酸配列を有するペプチドである請求項１記載の剤。

８．β－アミロイドの誘導体が、配列番号：１ないし配列番号：６で表される各々のアミノ酸配列から１番目～１０番目のアミノ酸配列が欠如したアミノ酸配列を有するペプチドであってＮ端のグルタミン酸がピログルタミン酸に変換したペプチドである請求項１記載の剤。

９．β－アミロイドまたはその誘導体のＣ端側の部分ペプチドが、各β－アミロイドのＮ端のアミノ酸から数えて２５番目以降のアミノ酸配列を有する部分ペプチドである請求項１記載の剤。

１０．抗体が配列番号：７で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識しない抗体である請求項１記載の剤。

１１．抗体が配列番号：５で表されるアミノ酸配列を有するβ－アミロイド（１－４２）を認識する抗体である請求項１記載の剤。

１２．抗体が、ＢＡ－２７（ＦＥＲＭ　ＢＰ－４１３９）で標示されるハイブリドーマ細胞から産生されうるモノクローナル抗体ＢＡ－２７ａである請求項１記載の剤。

１３．抗体が、ＢＣ－０５（ＦＥＲＭ　ＢＰ－４４５７）で標示されるハイブリドーマ細胞から産生されうるモノクローナル抗体ＢＣ－０５ａである請求項１記載の剤。

１４．抗体が、脳血液関門を透過する抗体である請求項１記載の剤。

１５．抗体が、形成された老人斑からβ－アミロイドを引き抜きうる抗体である請求項１４記載の剤。

１６．β－アミロイドの脳内での凝集または沈着の抑制剤である請求項１記載の剤。

１７．配列番号：５で表されるアミノ酸配列を有するペプチドの血中濃度を特異的に上昇させうる請求項１記載の剤。

１８．抗体が、脳血液関門を透過しない抗体である請求項１記載の剤。

１９．抗体が、末梢中のβ－アミロイドを末梢で捕捉しうる抗体である請求項１８記載の剤。

２０．哺乳動物に対して、β－アミロイドまたはその誘導体のＣ端側の部分ペプチドに特異的に反応し、かつ配列番号：８で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識しないモノクローナル抗体の有効量を投与することを特徴とするアルツハイマー病、軽度認知障害または脳アミロイドアンギオパチーの予防・治療方法。

２１．アルツハイマー病、軽度認知障害または脳アミロイドアンギオパチーの予防・治療剤を製造するための、β－アミロイドまたはその誘導体のＣ端側の部分ペプチドに特異的に反応し、かつ配列番号：８で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識しないモノクローナル抗体の使用。

２２．抗体が、配列番号：５で表されるアミノ酸配列を有するβ－アミロイド（１－４２）を認識するが、配列番号：１で表されるアミノ酸配列を有するβ－アミロイド（１－３８）、配列番号：２で表されるアミノ酸配列を有するβ－アミロイド（１－３９）および配列番号：３で表されるアミノ酸配列を有するβ－アミロイド（１－４０）を認識しない抗体である請求項１記載の剤。

[SEQUENCE LISTING]

<110> Takada Chemical Industries, Ltd.

<120> Use of antibody

<130> P04-146PCT

<150> JP2003-317443
<151> 2003-09-09

<160> 9

<210> 1
<211> 38
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1
```
Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
                 5                  10                  15
Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
            20                  25                  30
Gly Leu Met Val Gly Gly
        35
```

<210> 2
<211> 39
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2
```
Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
                 5                  10                  15
Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
            20                  25                  30
Gly Leu Met Val Gly Gly Val
```

35

<210> 3
<211> 40
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3
Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
5 10 15
Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
20 25 30
Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val
35 40

<210> 4
<211> 41
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4
Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
5 10 15
Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
20 25 30
Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile
35 40

<210> 5
<211> 42
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5
Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
5 10 15
Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile

```
             20                  25                  30
Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
         35                  40

<210> 6
<211> 43
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6
Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
                5                   10                  15
Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
             20                  25                  30
Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr
         35                  40

<210> 7
<211> 28
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7
Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
                5                   10                  15
Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys
             20                  25

<210> 8
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8
Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met
                5                   10
```

<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9
Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr
5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2004/013397

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl^7 A61K39/395, A61P25/28

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl^7 A61K39/395, A61P25/28

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA(STN), MEDLINE(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 94/17197 A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 04 August, 1994 (04.08.94), Full text & EP 683234 A & EP 1308461 A & US 5750349 A	1-19,21-22
Y	Frederique Bard et al., Peripherally administered antibodies against amyloid β-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease, Nature Medicine, Vol.6, No.8, 2000, pages 916 to 919	1-19,21-22

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.   ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 01 December, 2004 (01.12.04)	Date of mailing of the international search report 21 December, 2004 (21.12.04)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Ronald B. Demattos et al., Peripheral anti-Aβ antibody alters CNS and plasma Aβ clearance and decreases brain Aβ burden in a mouse model of Alzheimer's disease, PNAS, Vol.98, No.15, pages 8850 to 8855, 2001	1-19,21-22
Y	Dodart JC. et al., Immunization reverses memory deficits without reducing brain Aβ burden in Alzheimer's disease model, Nat. Neurosci., Vol.5, No.5, pages 452 to 457, 2002	1-19,21-22
Y	Donna M. Wilcock et al., Intracranially Administered Anti-Aβ Antibodies Reduce β-Amylooid Deposition by Mechanisms Both Independent of and Associated with Microglial Activation, The Journal of Neuroscience, Vol.23, No.9, pages 3745 to 3751, 01 May, 2003 (01.05.03)	1-19,21-22
A	Christoph Hock et al., Generation of antibodies specific for β-amyloid by vaccination of patients with Alzheimer disease, Nature medicine, Vol.8, No.11, pages 1270 to 1275, 2002	1-19,21-22
A	Anne K. et al., β-Amyloid Peptide Vaccination Results in Marked Changes in Serum and Brain Aβ Levels in APPswe/PS1 Δ E9 Mice, as Detected by SELDI-TOF-Based Protein Chip® Technology, DNA AND CELL BIOLOGY, Vol.20, No.11, pages 713 to 721, 2001	1-19,21-22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2004/013397

Box No. II **Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 20
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The invention as set forth in claim 20 pertains to methods for treatment of the human body by therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT (continued to extra sheet.)

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III **Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box No.II-1 of continuation of first sheet(2)

and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

国際調査報告	国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２００４／０１３３９７

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Ｉｎｔ．Ｃｌ⁷　Ａ６１Ｋ　３９／３９５，　Ａ６１Ｐ　２５／２８

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Ｉｎｔ．Ｃｌ⁷　Ａ６１Ｋ　３９／３９５，　Ａ６１Ｐ　２５／２８

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

ＣＡ（ＳＴＮ），ＭＥＤＬＩＮＥ（ＳＴＮ）

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
Ｙ	ＷＯ　９４／１７１９７　Ａ（武田薬品工業株式会社） １９９４．０８．０４，全文 ＆ＥＰ　６８３２３４　Ａ　＆ＥＰ　１３０８４６１　Ａ ＆ＵＳ　５７５０３４９　Ａ	1-19, 21-22
Ｙ	Frederique Bard et al., Peripherally administered antibodies against amyloid β-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease, Nature Medicine, Vol.6, No.8, 2000, p.916-919	1-19, 21-22

☒ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。　　☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
- 「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
- 「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
- 「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 ０１．１２．２００４	国際調査報告の発送日　21.12.2004
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 郵便番号１００－８９１５ 東京都千代田区霞が関三丁目４番３号	特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｃ　９２６１ 八原　由美子 電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４５１

Ｃ（続き）．関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
Y	Ronald B. DeMattos et al., Peripheral anti-Aβ antibody alters CNS and plasma Aβ clearance and decreases brain Aβ burden in a mouse model of Alzheimer's disease, PNAS, Vol.98, No.15, p.8850-8855, 2001	1-19, 21-22
Y	Dodart JC et al., Immunization reverses memory deficits without reducing brain Aβ burden in Alzheimer's disease model, Nat. Neurosci., Vol.5, No.5, p.452-457, 2002	1-19, 21-22
Y	Donna M. Wilcock et al., Intracranially Administered Anti-Aβ Antibodies Reduce β-Amylooid Deposition by Mechanisms Both Independent of and Associated with Microglial Activation, The Journal of Neuroscience, Vol.23, No.9, p.3745-3751, 2003.05.01	1-19, 21-22
A	Christoph Hock et al., Generation of antibodies specific for β-amyloid by vaccination of patients with Alzheimer disease, Nature medicine, Vol.8, No.11, p.1270-1275, 2002	1-19, 21-22
A	Anne K. et al., β-Amyloid Peptide Vaccination Results in Marked Changes in Serum and Brain Aβ Levels in APPswe/PS1ΔE9 Mice, as Detected by SELDI-TOF-Based ProteinChip® Technology, DNA AND CELL BIOLOGY, Vol.20, No.11, p.713-721, 2001	1-19, 21-22

第Ⅱ欄　請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第１ページの２の続き）

法第８条第３項（ＰＣＴ１７条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

１．☒ 請求の範囲　２０　は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲２０に記載のものは、治療による人体の処置方法に関するものであって、ＰＣＴ１７条(2)(a)(i)及びＰＣＴ規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。

２．□ 請求の範囲＿＿＿＿＿＿は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

３．□ 請求の範囲＿＿＿＿＿＿は、従属請求の範囲であってＰＣＴ規則6.4(a)の第２文及び第３文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄　発明の単一性が欠如しているときの意見（第１ページの３の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

１．□ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。

２．□ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

３．□ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。

４．□ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意
□ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
□ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

English translation of WO 2005/25616
Our Ref: TO12

English translation of the specification of WO 2005/25616

Use of Antibody

Technical Field

The present invention relates to a preventive/therapeutic agent or a diagnostic agent for Alzheimer's disease and the like. More specifically, the present invention relates to a preventive/therapeutic agent or a diagnostic agent for Alzheimer's disease and the like comprising a monoclonal antibody specifically reacting to a partial peptide of the C terminus of a beta-amyloid (Aβ) or a derivative thereof.

Background Technology

Senile dementia caused by Alzheimer's disease is a serious social problem, and the early establishment of a method of prevention/treatment of Alzheimer's disease is desired. As a typical lesion in the brain of a patient having Alzheimer's disease, over-generation of senile plaque amyloid and a change of neurofibril are known, and one of the main components of senile plaque is a beta-amyloid or a derivative thereof.

The beta-amyloid is a peptide consisting of about 40-43 amino acids, and is encoded near the transmembrane region in a cell of an amyloid precursor protein (hereinafter refereed to as "APP"). The amino acid sequence of each beta-amyloid is as follows:

Beta-amyloid (1-38)=SEQ ID NO: 1
Beta-amyloid (1-39)=SEQ ID NO: 2
Beta-amyloid (1-40)=SEQ ID NO: 3

Beta-amyloid (1-41)=SEQ ID NO: 4
Beta-amyloid (1-42)=SEQ ID NO: 5
Beta-amyloid (1-43)=SEQ ID NO: 6

Further, recently, it has been reported that among the beta-amyloids, mainly the beta-amyloid (1-42) is deposited in the brain cortex (senile plaque) at early time, and mainly the beta-amyloid (1-40) is deposited in a blood vessel in the brain (amyloid angiopathy) (Arch. Biochem. Biophys., 301, 41-53, 1993), and it has been suggested that the deposition of a water-soluble beta-amyloid (1-40) and the like is caused by a peptide comprising the C-terminal part of the beta-amyloid (1-42), the beta-amyloid (26-42), the beta-amyloid (26-43), the beta-amyloid (34-42) or the like (Biochemistry, 32, 4693-4697, 1993). Therefore, the deposition of the beta-amyloid (x-42) is considered to be the most important cause of Alzheimer's disease, and in view of these reports, it is considered that the difference of deposition method between the beta-amyloid (x-40) and the beta-amyloid (x-42) is significantly associated with Alzheimer's disease

For this reason, it is considered to be important to sensitively differentiate and quantify the beta-amyloid (x-40) and the beta-amyloid (x-42). International publication WO 94/17197 pamphlet discloses an antibody specifically reacting to a partial peptide of the C terminus of a beta-amyloid or a derivative thereof, and a method for measuring a beta-amyloid having a C-terminal hydrophobic region using the antibody. However, the direct effectiveness of the antibody for prevention/treatment of Alzheimer's disease is not known.

Regarding the treatment of Alzheimer's disease directly by a beta-amyloid vaccine, reports can be seen, for example, in Nature, 400, 173-177, 1999; Nature Medicine, 9(4), 448-452, 2003 and the like. The successful results such as the decrease in senile plaque, the improvement of learning ability and the like were obtained by the pre-clinical test using human APP transgenic mice and the like. It was expected that the epoch-making method of treatment would be established. However, in the recently-performed second phase clinical test, an unanticipated serious side effect was caused, which even had a case of death. It is considered that the main cause of the serious side effect is the onset of encephalitis due to the invasion of $CD4^+$ lymphocytes into the brain, which is not seen in the case of ordinary Alzheimer's disease.

Since it has been confirmed that the immunotherapy results in the dramatical decrease in senile plaque deposited within the brain and the improvement of cognition ability also in human (Neuron, 38, 547-555, 2003), passive immunization, in which an anti-beta-amyloid antibody is administered peripherally, is considered as one of the methods for avoiding the side effect without losing the above-described merit, and the studies using a monoclonal antibody has been carried out at the animal level (Science, 295, 2264-2267, 2002; Nature Neuroscience, 5, 452-457, 2002). However, it is reported that, in the study using model mice having cerebral amyloid angiopathy (CAA), exacerbation of bleeding from blood vessels in the brain caused by CAA occurred by administering an anti-N-terminal beta-amyloid antibody (Science, 298, 1379, 2002).

Regarding the experiment of passive immunization at the animal level using an antibody having a N-terminal or a medial part of a beta-amyloid as an epitope, though the increase in the concentration of the beta-amyloid in blood was reported

(Science, Vol. 295, pages 2264-2267, 2002; Nature Neuroscience, Vol. 5, pages 452-457, 2002; Nature Medicine, 8, 1263-1269, 2002; and Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 100, 2023-2028, 2003), there is no report of immunotherapy which specifically increased the concentration of the beta-amyloid (x-42) having high aggregation ability in blood.

Disclosure of the Invention

At present, no effective method for prevention/treatment of Alzheimer's disease has been established, though the possibility that the beta-amyloid is one of the causative substances of Alzheimer's disease has been pointed out and a deep interest in the beta-amyloid has been shown. Further, with respect to the immunotherapy of Alzheimer's disease, when using an antibody specifically reacting to a partial peptide of the N-terminal of the beta-amyloid, the medial part of the beta-amyloid, or the C terminus of the beta-amyloid (x-40), for example, it induces inflammation against the beta-amyloid (x-40) deposited on a wall of blood vessel in the brain (CAA), which may cause intracerebral hemorrhage. In view of this, it cannot necessarily be said to be the sufficiently safe method of prevention/treatment of Alzheimer's disease.

Thus, currently, a more effective and safe method of prevention/treatment of Alzheimer's disease is desired.

The present inventors diligently studied in order to solve the above-described problem, and when subcutaneously administering a monoclonal antibody BC 05a, which specifically reacts to a partial peptide of the C terminus of the beta-amyloid, to model mice having Alzheimer's disease, the inventors found that the deposition of the beta-amyloid within the brain was unexpectedly suppressed, and that only the concentration of the beta-amyloid (x-42) in blood was selectively increased without the increase of the concentration of the beta-amyloid (x-40) in blood. Based on these findings, the present inventors further proceeded with the study and completed the present invention.

That is to say, the present invention provides the following matters:

(1) A preventive/therapeutic agent for Alzheimer's disease, light cognitive disorder or brain amyloid angiopathy comprising a monoclonal antibody specifically reacting to a partial peptide of the C terminus of a beta-amyloid or a derivative thereof, and not recognizing a partial peptide having the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 8;

(2) The agent according to the item (1) which is a preventive/therapeutic agent for Alzheimer's disease;

(3) The agent according to the item (1) which is an antibody not recognizing a partial peptide having the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 9;

(4) The agent according to the item (1) which is an antibody recognizing a partial peptide having the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 9;

(5) The agent according to the item (1), wherein the beta-amyloid is a peptide having an amino acid sequence of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 or SEQ ID NO: 6;

(6) The agent according to the item (1), wherein the beta-amyloid is a peptide having an amino acid sequence of SEQ ID NO: 5;

(7) The agent according to the item (1), wherein the beta-amyloid derivative is a peptide having the amino acids Nos. 2-42 of the amino acid sequence of SEQ ID NO: 5; a peptide having the amino acids Nos. 3-42 of the amino acid sequence of SEQ ID NO: 5 having N-terminal glutamic acid substituted with pyroglutamic acid; or a peptide having the amino acids Nos. 4-42 of the amino acid sequence of SEQ ID NO: 5;

(8) The agent according to the item (1), wherein the beta-amyloid derivative is a peptide having an amino acid sequence of any one of SEQ ID NOS: 1-6 wherein amino acids Nos. 1-10 are deleted therefrom, and having a N-terminal glutamic acid substituted with pyroglutamic acid;

(9) The agent according to the item (1), wherein the beta-amyloid or the derivative thereof has a C-terminal partial peptide which is a partial peptide having an amino acid sequence of amino acid position No. 25 or later from the N-terminus of the beta amyloid;

(10) The agent according to the item (1) which is an antibody not recognizing a partial peptide having the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 7;

(11) The agent according to the item (1) which is an antibody recognizing a beta-amyloid (1-42) having the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 5;

(12) The agent according to the item (1) which is monoclonal antibody BA-27a producible from a hybridoma set forth under BA-27 (FERM BP-4139);

(13) The agent according to the item (1) which is monoclonal antibody BC-05a producible from a hybridoma set forth under BC-05 (FERM BP-4457);

(14) The agent according to the item (1) which is an antibody

permeable to the blood brain barrier;

(15) The agent according to the item (14) which is an antibody capable of removing beta-amyloid from a formed senile plaque;

(16) The agent according to the item (1) which is an inhibitor of aggregation or deposition of beta-amyloid in the brain;

(17) The agent according to the item (1) which is capable of specifically increasing the blood concentration of a peptide having the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 5;

(18) The agent according to the item (1) which is an antibody impermeable to the blood brain barrier;

(19) The agent according to the item (18) which is an antibody capable of capturing peripheral beta-amyloid in the periphery;

(20) A method of preventing/treating Alzheimer's disease, light cognitive disorder or brain amyloid angiopathy comprising the step of administering to a mammal an effective amount of a monoclonal antibody specifically reacting to a partial peptide of the C terminus of a beta-amyloid or a derivative thereof, and not recognizing a partial peptide having the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 8;

(21) Use of a monoclonal antibody specifically reacting to a partial peptide of the C terminus of a beta-amyloid or a derivative thereof, and not recognizing a partial peptide having the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 8 for manufacturing a preventive/therapeutic agent of Alzheimer's disease, light cognitive disorder or brain amyloid angiopathy;

(22) The agent according to the item (1) which is an antibody recognizing beta-amyloid (1-42) having the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 5, but not recognizing beta-amyloid (1-38) having the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 1, beta-amyloid (1-39) having the amino acid sequence set forth

in SEQ ID NO: 2, or beta-amyloid (1-40) having the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 3; and the like.

Best Embodiment for Carrying Out the Invention

Regarding the hybridomas generating the anti-beta-amyloid antibodies used in the present invention, BA-27 has been deposited to Institute for Fermentation (IFO) (2-17-85, Jusanboncho, Yodogawa-ku, Osaka (postal code: 532-8686)) from December 22, 1992 as IFO 50387, and to Ministry of International Trade and Industry, National Institute of Bioscience and Human Technology (NIBH) (currently, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Patent Organism Deposit Center (Chuo-6th, 1-1-1, Higashi, Tsukuba-shi, Ibaraki (postal code: 305-8566))) from January 7, 1993 as FERM BP-4139.

BC-05 has been deposited to Ministry of International Trade and Industry, National Institute of Bioscience and Human Technology (NIBH) (currently, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Patent Organism Deposit Center (Chuo-6th, 1-1-1, Higashi, Tsukuba-shi, Ibaraki (postal code: 305-8566))) from November 2, 1993 as FERM BP-4457.

In the present specification, each antibody obtained from each hybridoma is indicated by adding the character "a" after the name of each cell.

Regarding SEQ ID NOS used in the present specification, SEQ ID NOS: 1-9 represent the following amino acid sequences of peptide.

[SEQ ID NO: 1] Beta-amyloid (1-38)
[SEQ ID NO: 2] Beta-amyloid (1-39)
[SEQ ID NO: 3] Beta-amyloid (1-40)

[SEQ ID NO: 4] Beta-amyloid (1-41)
[SEQ ID NO: 5] Beta-amyloid (1-42)
[SEQ ID NO: 6] Beta-amyloid (1-43)
[SEQ ID NO: 7] Beta-amyloid (1-28)
[SEQ ID NO: 8] Beta-amyloid (25-35)
[SEQ ID NO: 9] Beta-amyloid (35-43)

In a protein (polypeptide) in the present specification, the left end is the N-terminus (amino terminus) and the right end is the C-terminus (carboxyl terminus) according to the conventional indication of peptides. In the proteins used in the present invention such as a polypeptide comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 and the like, the C-terminus may be any one of carboxyl group, carboxylate, amide and ester.

The following beta-amyloids can be used in the present invention: the beta-amyloid (1-38) having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1; the beta-amyloid (1-39) having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 2; the beta-amyloid (1-40) having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 3; the beta-amyloid (1-41) having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 4; the beta-amyloid (1-42) having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 5; the beta-amyloid (1-43) having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 6 and the like (preferably, the beta-amyloid (1-42) having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 5 is used).

Examples of the beta-amyloid derivatives used in the present invention include: the above-described beta-amyloids, wherein about 1-17 residues are deleted from the amino acids of the N-terminus; the above-described beta-amyloids, wherein

L-asparaginic acid is isomerized to L-isoasparaginic acid, D-isoasparaginic acid, or D-asparaginic acid; the above-described beta-amyloids having pyroglutamic acid at the N-terminus; a peptide having an amino acid sequence wherein amino acids Nos. 1-10 are deleted from the N-terminus of the above-described beta-amyloids, and having a N-terminal glutamic acid substituted with pyroglutamic acid and the like. Specifically, the following peptides can be used: a peptide having the amino acids Nos. 2-42 of the amino acid sequence of SEQ ID NO: 5; a peptide having the amino acids Nos. 3-42 of the amino acid sequence of SEQ ID NO: 5 having N-terminal glutamic acid substituted with pyroglutamic acid; a peptide having the amino acids Nos. 4-42 of the amino acid sequence of SEQ ID NO: 5; a peptide having an amino acid sequence of any one of SEQ ID NOS: 1-6 wherein amino acids Nos. 1-16 or 1-17 are deleted therefrom (e.g., the beta-amyloid (17-40), the beta-amyloid (18-40) and the like) and the like. These beta-amyloids or derivatives thereof may be prepared from a mammal such as human, monkey, rat, mouse and the like using a publicly known method, and may also be commercially available naturally-purified samples. Synthetic peptides can also be used.

Examples of partial peptides of the C-terminus of a beta-amyloid or a derivative thereof in the present invention include a partial peptide having an amino acid sequence of amino acid position No. 25 or later from the N-terminus of the beta amyloid.

The above-described beta-amyloids or derivatives thereof may be used, for example, as a salt with a physiologically acceptable acid (e.g., an inorganic acid and an organic acid), a base (e.g., alkali metal salt) or the like (preferably a physiologically acceptable acid-added salt. Examples of such salts include a salt with an inorganic acid (e.g., hydrochloric acid, phosphoric acid, hydrobromic acid and sulfuric acid), a salt with an organic acid (e.g., acetic acid, formic acid, propionic acid, fumaric acid, maleic acid, succinic acid, tartaric acid, citric acid, malic acid, oxalic acid, benzoic acid, methansulfonic acid and benzenesulfonic acid).

Examples of monoclonal antibodies specifically reacting to a partial peptide of the C terminus of a beta-amyloid or a derivative thereof used the present invention (hereinafter may be referred to as just "antibody") include an antibody recognizing a beta-amyloid or a derivative thereof, but not recognizing a partial peptide having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 7 (i.e., a partial peptide of the N terminus of the beta-amyloid represented by the beta-amyloid (1-28)). Further, an antibody recognizing a beta-amyloid or a derivative thereof, but not recognizing a partial peptide having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 8 (i.e., a partial peptide of the central part of the beta-amyloid represented by the beta-amyloid (25-35)); an antibody recognizing a beta-amyloid or a derivative thereof, but not recognizing a partial peptide having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 9 (i.e., a partial peptide of the C terminus of the beta-amyloid represented by the beta-amyloid (35-43)); and the like may also be used. More specifically, among these antibodies, the following antibodies are preferred:
(i) an antibody not recognizing a partial peptide having the amino acid sequence represented by SEQ ID NOS: 8 and 9 (i.e., the beta-amyloid (25-35) and the beta-amyloid (35-43));
(ii) an antibody not recognizing a partial peptide having the

amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 8 (i.e., the beta-amyloid (25-35)), but recognizing a partial peptide having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 9 (i.e., the beta-amyloid (35-43)); and the like.

As the above-described antibody in (i), an antibody specifically recognizing the beta-amyloid (1-38) having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1, the beta-amyloid (1-39) having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 2 and/(or) the beta-amyloid (1-40) having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 3 is preferred; and an antibody recognizing the beta-amyloid (1-38) having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1, the beta-amyloid (1-39) having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 2 and the beta-amyloid (1-40) having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 3, but not recognizing the beta-amyloid (1-42) having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 5 is more preferred.

As the above-described antibody in (ii), an antibody specifically recognizing a beta-amyloid contained in brain formic acid extract of a patient having Alzheimer's disease (in particular, the beta-amyloid (1-42) having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 5) is preferred, and an antibody recognizing the beta-amyloid (1-42) having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 5, but not recognizing the beta-amyloid (1-38) having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1, the beta-amyloid (1-39) having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 2 and the beta-amyloid (1-40) having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 3 is more preferred.

A typical example of the above-described antibody in (i) is a monoclonal antibody indicated as BA-27a (see International Publication WO 94/17197 pamphlet). A typical example of the above-described antibody in (ii) is a monoclonal antibody indicated as BC-05a, BC-15a, BC-65a, BC-75a, or BC-55a (in particular, BC-05a is preferred) (see International Publication WO 94/17197 pamphlet).

Regarding a method for preparing an antigen corresponding to an antibody and a method for manufacturing an antibody, a publicly known method, for example, a method described in the International Publication WO 94/17197 pamphlet and a method similar to the method of WO 94/17197 can be used. Examples thereof will be described below.

(1) Preparation of Antigen

As an antigen used for preparing the antibody of the present invention, any one of a beta-amyloid, a derivative thereof, a partial peptide obtained by hydrolyzing a beta-amyloid or a derivative thereof, a synthetic peptide having one or more antigenic determinants identical to those of a beta-amyloid and the like can be used (hereinafter these may be referred to as just "beta-amyloid antigen"). As the beta-amyloid or the derivative thereof, the aforementioned ones may be used. Such beta-amyloids or derivatives thereof may be prepared using a publicly known method or a method similar thereto from a mammal such as human, monkey, rat, mouse and the like. Commercially available naturally-purified samples or synthetic peptides can also be used.

The aforementioned beta-amyloid or the derivative thereof, or the salt thereof can be manufactured using a method similar to a publicly known method such as the one described in the International Publication WO 02/06483 pamphlet.

Further, the following methods can also be used: (a) preparation using a publicly known method or a method similar thereto from tissue or a cell of a mammal such as human, monkey, rat, mouse and the like; (b) publicly known chemical synthesis method for peptide using a peptide synthesizer and the like; and (c) culture of a transformant containing a DNA coding for a polypeptide comprising a desired amino acid sequence or a salt thereof.

(a) When preparing a beta-amyloid antigen from tissue or a cell of a mammal, the tissue or cell is homogenized, and then extraction is carried out using an acid, an alcohol or the like. After that, the extracted liquid can be purified and isolated by coupling methods such as salting out, dialysis, gel filtration, and chromatography such as reversed-phase chromatography, ion-exchange chromatography, affinity chromatography and the like.

(b) When preparing a beta-amyloid antigen chemically, as a synthetic peptide, for example, a peptide having the same structure as that of the aforementioned beta-amyloid antigen naturally purified may be used.

(c) When manufacturing a polypeptide comprising a desired amino acid sequence or a derivative thereof using a transformant containing a DNA, the DNA can be produced according to a publicly known cloning method (e.g., the method described in Molecular Cloning (2nd ed.; J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989)). Examples of the cloning methods include: (1) a method for obtaining a transformant containing a DNA coding for a polypeptide comprising a desired amino acid sequence or a salt thereof from the cDNA library using the hybridization method, in which a DNA probe or a DNA primer designed based on the amino acid sequence of the polypeptide comprising a desired amino acid sequence or the salt thereof is used; (2) a method for obtaining a transformant containing a DNA coding for a polypeptide comprising a desired amino acid sequence or a salt thereof using the PCR method, in which a DNA primer designed based on the amino acid sequence of the polypeptide comprising a desired amino acid sequence or the salt thereof is used; and the like.

As the partial peptide obtained by hydrolyzing the beta-amyloid, for example, a partial peptide obtained by serially hydrolyzing the beta-amyloid (1-43) comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 6 and the like from the N-terminus and/(or) the C-terminus using an exoprotease such as an aminopeptidase, carboxypeptidase and the like or a mixture thereof; a partial peptide obtained by hydrolyzing the beta-amyloid (1-43) using various endopeptidases or a mixture thereof; and the like may be used. When preparing the beta-amyloid (1-42) using this method, there may be a case wherein the beta-amyloid (1-41) and/(or) the beta-amyloid (1-43) are mixed in the sample. As the synthetic peptide, for example, a peptide having the same structure as that of the above-described naturally-purified beta-amyloid antigen; a peptide comprising one or more types of amino acid sequences identical to the amino acid sequences at any position comprising 3 or more amino acids, preferably 6 or more amino acids in the amino acid sequence of the beta-amyloid (1-43) and the like; and the like may be used (hereinafter referred to as "beta-amyloid-related synthetic peptide").

The above-described synthetic peptides may be manufactured using a publicly known common practice, and both a solid phase synthesis method and a liquid phase synthesis method may be employed for the production. That is to say, a targeted peptide can be manufactured by condensing a partial peptide or amino acids capable of constituting the peptide with a remaining part, and further, when a product has a protecting group, by eliminating the protecting group. The concrete and publicly known condensation methods and methods for eliminating a protecting group are described in, for example, B. Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85. 2149 (1963); M. Bodanszky and M. A. Ondetti, Peptide Synthesis, Interscience Publications, New York, 1996; Schroder and Lubke, The Peptide, Academic Press, New York, 1965; Nobuo Izumiya et al., Foundation and Experimentation of Peptide Synthesis, Maruzen, 1985; Haruaki Yajima and Shunpei Sakakibara, Biochemical Experimentation Course 1, Chemistry of Protein IV, 205, 1977; and the like. For example, when synthesizing a beta-amyloid or a beta-amyloid-related synthetic peptide using the solid phase synthesis method, any one of resins, which are known as insoluble resins in this technical field (e.g., chloromethyl resin, 4-oxymethylphenylacetamidemethyl resin and the like) may be used, and protecting amino acids are serially condensed from the C-terminus of the beta-amyloid or the beta-amyloid-related synthetic peptide according to the conventional method. Next, all protecting groups are removed by hydrofluorination, and purification is carried out using a publicly known method such as high-performance liquid chromatography and the like to obtain the targeted beta-amyloid or the beta-amyloid-related synthetic peptide. A N-protecting amino acid can be manufactured by protecting an alpha-amino group by a Boc group, and further, for example, by protecting a hydroxyl group of serine and threonine by a Bzl group, protecting an omega-carboxyl group of glutamic acid and asparaginic acid by an OBzl group, protecting a ε-amino group of lysine by a Cl-Z group, protecting a hydroxyl group of tyrosine by a Br-Z group, protecting a guanido group of arginine by a Tos group and protecting an imidazole group of histidine by a Bom group. After the reaction occurrs, a general purification method, e.g., solvent extraction, distillation, column chromatography, liquid chromatography, recrystallization and the like can be used in combination to purify and isolate the peptide. When the peptide obtained using the above-described method is a free body, it can be converted into a suitable salt thereof using a publicly known method. When the obtained peptide is in the form of salt, it can be converted into a free body using a publicly known method.

As an amide body of peptide, a commercially available peptide synthesizing resin suitable for amide formation can be used. Examples of such resins include chloromethyl resin, hydroxymethyl resin, benzhydrylamine resin, aminomethyl resin, 4-benzyloxybenzyl alcohol resin, 4-methylbenzhydrylamine resin, PAM resin, 4-hydroxymethylmethylphenylacetamidemethyl resin, polyacrylamide resin, 4-(2',4'-dimethoxyphenyl-hydroxymethyl) phenoxy resin, 4-(2',4'-dimethoxyphenyl-Fmoc aminoethyl) phenoxy resin and the like. Using such a resin, amino acids, whose alpha-amino group and side-chain functional group are suitably protected, are condensed to a targeted peptide alignment on a resin according to a publicly known condensation method. After the reaction, the peptide is cut out from the resin and simultaneously various protecting groups are removed to obtain the targeted peptide. The targeted peptide can also be obtained by taking out a partially protected peptide using chlorotrityl resin, oxime resin, 4-hydroxybenzoic acid type resin and the like, and removing protecting groups by a conventional method.

Regarding condensation of the above-described protected amino acids, various activating reagents, which can be used in peptide synthesis, can be used, and in particular, a carbodiimide type is preferred. Examples of carbodiimide types include DCC, N,N'-diisopropyl carbodiimide, N-ethyl-N'-(3-dimethylaminoprolyl) carbodiimide and the like. In the activation using these reagents, the protected amino acids can be added directly to a resin together with a racemization-suppressing additive (e.g., HOBt, HOOBt and the like), or after amino acids, which are protected in advance as symmetric acid anhydride, HOBt ester or HOOBt ester, are activated, they can be added to the resin. A solvent used in the activation of the protected amino acids and the condensation thereof with the resin can be suitably selected from solvents, which are known to be able to be used in peptide condensation reaction. Examples of such solvents include: acid amides such as N,N-dimethylformamide, N,N-dimethylacetamide, N-methylpyrolidone and the like; halogenated hydrocarbons such as methylene chloride, chloroform and the like; alcohols such as trifluoroethanol and the like; sulfoxides such as dimethylsulfoxide and the like; tertiary amines such as pyridine and the like; ethers such as dioxane, tetrahydrofuran and the like; nitriles such as acetonitrile, propionitrile and the like; esters such as methyl acetate, ethyl acetate and the like; suitable mixtures thereof and the like. A reaction temperature can be suitably selected from the range which is known to be able to be used in peptide bonding reaction, and generally, suitably selected from the range from about -20°C to about 50°C. An activated amino acid derivative is generally used in an amount of about from 1.5 to 4-fold excess. Results of a test using a ninhydrin reaction show that, when condensation is insufficient, condensation reaction can be repeated in order to perform sufficient condensation without eliminating a protecting group. When sufficient condensation cannot be obtained even if the reaction is repeated, unreacted amino acids can be acetylated using acetic anhydride or acetylimidazole so as not to affect reactions thereafter.

Examples of protecting groups of amino groups of raw material amino acids include Z, Boc, tertiary pentyloxycarbonyl, isobornyloxycarbonyl, 4-methoxybenzyloxycarbonyl, Cl-Z, Br-Z, adamantyloxycarbonyl, trifluoroacetyl, phthaloyl, formyl, 2-nitrophenylsulphenyl, diphenylphosphinothioyl, Fmoc and the like. Examples of protecting groups of carboxyl groups include C_{1-6} alkyl group, C_{3-8} cycloalkyl group, C_{7-14} aralkyl group, 2-adamantyl, 4-nitrobenzyl, 4-methoxybenzyl, 4-chlorobenzyl, phenacyl/benzyl oxycarbonylhydrazide, tertiary butoxycarbonylhydrazide, tritylhydrazide and the like.

Hydroxyl groups of serine and threonine can be protected, for example, by esterification or etherification. Examples of groups suitable for the esterification include: lower molecular weight (C_{1-6}) alkanoyl group such as acetyl group and the like; aroyl group such as benzoyl group and the like; groups derived from carbonic acids such as benzyloxycarbonyl group, ethoxycarbonyl group and the like. Examples of groups suitable for the etherification include benzyl group, tetrahydropyranyl group, t-butyl group and the like.

Examples of protecting groups of phenolic hydroxyl group of tyrosine include Bzl, Cl-Bzl,2-nitrobenzyl, Br-Z, t-butyl and the like.

Examples of protecting groups of imidazole of histidine include Tos, 4-methoxy-2,3,6-trimethylbenzenesulfonyl, DNP, Bom, Bum, Boc, Trt, Fmoc and the like.

Examples of activated raw material carboxyl groups include corresponding acid anhydride, azide, active ester (ester coupled with alcohol (e.g., pentachlorophenol, 2,4,5-trichlorophenol, 2,4-dinitrophenol, cyanomethyl alcohol, paranitrophenol, HONB, N-hydroxysuccinimide, N-hydroxyphthalimide, HOBt)) and the like. Examples of activated raw material amino groups include corresponding amide phosphate and the like.

Examples of methods for removing (eliminating) protecting groups include: catalytic reduction in a hydrogen stream in the presence of a catalyst such as Pd-black, Pd-carbon and the like; acid treatment using anhydrous hydrogen fluoride, methansulfonic acid, trifluoromethansulfonic acid, trifluoroacetic acid, mixture thereof and the like; base treatment using diisopropylethylamine, triethylamine, piperidine, piperazine and the like; reduction using sodium in liquid ammonia and the like. An elimination reaction by the above-described acid treatment is generally performed at a temperature ranging from -20°C to 40°C. In the acid treatment, addition of a cation-trapping agent such as anisole, phenol, thioanisole, metacresol, paracresol, dimethylsulfide, 1,4-butanedithiol, 1,2-ethanedithiol and the like is effective. A 2,4-dinitrophenyl group used as an imidazole-protecting group of histidine can be removed by thiophenol treatment. A formyl group used as an indole-protecting group of tryptophan can be removed by alkali treatment using diluted sodium hydroxide, diluted ammonia and the like as well as the above-described acid treatment for eliminating protecting groups in the presence of 1,2-ethanedithiol, 1,4-butanedithiol and the like.

A method for protecting a functional group, which should not be involved with the reaction of the raw material, and a protecting group, and a method for activating a functional group involved with the elimination and reaction of the protecting group can be suitably selected from publicly known groups/means.

In another method for obtaining an amide body of a peptide, an alpha-carboxyl group of an amino acid at the terminus of carboxyl is amidated, and then, a peptide chain is extended to a desired length at the amino group side. After that, a peptide in which only the protecting group of the alpha-amino group of the N-terminus of the peptide chain is removed, and a peptide in which only the protecting group of the carboxyl group of the C-terminus is removed (or amino acids), are manufactured, and the obtained peptides are condensed in the above-described mixed solvent. The details of the condensation reaction are as described above. After the protecting peptide obtained by the condensation is purified, all protecting groups are removed using the above-described method to obtain a desired crude peptide. The crude peptide is purified utilizing already-known various purification means. By lyophilizing main fractions thereof, a desired amide body of peptide can be obtained.

Regarding an ester body of a peptide, after the alpha-carboxyl group of the amino acid at the terminus of carboxyl is condensed with a desired type of alcohol to obtain an amino acid ester, a desired ester body of the peptide can be obtained in the same way as the case of the amide body of the peptide.

Since a beta-amyloid antigen tends to be easily aggregated, an insolubilized beta-amyloid antigen may be directly immunized. Further, a complex in which the beta-amyloid antigen is bound or adsorbed to a suitable carrier may be immunized. Any type of carrier can bind or adsorb to the beta-amyloid antigen (hapten) at any mixing ratio as long as an antibody against the beta-amyloid antigen bound or adsorbed to the carrier is generated efficiently. Generally, a natural or synthetic high polymer carrier commonly used for producing an antibody against a hapten antigen can bind or adsorb to the beta-amyloid antigen wherein the weight ratio of the hapten antigen to the carrier is 1: 0.1-100. Examples of natural high polymer carriers include: serum albumin from a mammal such as bovine, rabbit, human and the like; thyroglobulin from a mammal such as bovine, rabbit and the like; hemoglobin from a mammal such as bovine, rabbit, human, sheep and the like; keyhole limpet hemocyanin and the like. As a synthetic high polymer carrier, various latexes such as polymerized materials or copolymerized materials of polyamino acids, polystylenes, polyacryls, polyvinyls, polypropylenes and the like can be used.

When coupling a hapten with a carrier, various condensation agents can be used. For example, advantageously used are: a diazonium compound such as bisdiazotized benzidine crosslinking tyrosine, histidine and tryptophane; a dialdehyde compound such as glutaraldehyde crosslinking between amino groups; a diisocyanate compound such as toluene-2,4-diisocyanate; a dimaleimido compound such as N,N'-o-phenylenedimaleimido crosslinking between thiol groups; a maleimido active ester compound crosslinking an amino group and a thiol group; a carbodiimide compound crosslinking an amino group and a carboxyl group and the like. Moreover, when crosslinking between amino groups, after an active ester reagent having a dithiopyridyl group (e.g., 3-(2-pyridyldithio) propionic acid N-succinimidyl (SPDP) and the like) is reacted with one of the amino groups, its reduction is performed to introduce a thiol group, and after a maleimido group is introduced to the other amino group using a maleimido active ester reagent, the amino groups can be reacted with each other.

(2) Preparation of Monoclonal Antibody

The beta-amyloid antigen is administered solely or in combination with a carrier and a diluent to a warm-blooded animal at its site capable of generating an antibody using an administration method such as intraperitoneal injection, intravenous injection, subcutaneous injection and the like. In order to improve the antibody generation ability, complete Freund's adjuvant or incomplete Freund's adjuvant can be administered with the beta-amyloid antigen. The administration is generally carried out about 2-10 times at from 2 to 6-week intervals. Examples of warm-blooded animals include monkey, rabbit, dog, guinea pig, mouse, rat, sheep, goat, fowl and the like. When preparing a monoclonal antibody, mouse, rat and the like are preferably used.

When preparing a monoclonal antibody, from warm-blooded animals such as mice immunized with the beta-amyloid antigen, individuals in which the antibody titer is recognized are selected, and 2-5 days after the final immunization, the pancreas or the lymph node is collected and an antibody generation cell contained therein is fused with a myeloma cell to prepare an anti-beta-amyloid monoclonal antibody generation hybridoma. The anti-beta-amyloid antibody titer in blood serum can be obtained, for example, by reacting the below-described labeled beta-amyloid with antiserum and measuring the activity of the labeling agent bound to the antibody. The fusion operation can be carried out according to an already-known method such as the method of Kohler and Milstein (Nature, 256, 495 (1975)). Examples of fusion accelerating agents include polyethylene glycol (PEG), Sendai virus and the like, and among them, PEG and the like are preferably used. Examples of myeloma cells include NS-1, P3U1, SP2/0, AP-1 and the like, and among them, P3U1 and the like are preferably used. The preferable ratio of the number of antibody generation cells (pancreatic cells) to the number of myeloma cells to be used is generally about from 1:1 to 20:1, and PEG (preferably PEG 1000-PEG 6000) is added thereto at a concentration of about 10-80%. The mixture is incubated generally at 20-40°C, preferably at 30-37°C, generally for 1-10 minutes to efficiently perform cell fusion.

Various methods can be used for screening the anti-beta-amyloid antibody generation hybridoma. Examples of the methods include: a method wherein a hybridoma culture supernatant is added to a solid phase (e.g., microplate) to which the beta-amyloid or the beta-amyloid-related synthetic peptide is adsorbed directly or together with a carrier, and then, an anti-immunoglobulin antibody (when a cell to be used in the cell fusion is from a mouse, an anti-mouse immunoglobulin antibody is used), which is labeled with a radioactive substance, an enzyme or the like, or a protein A is further added thereto to detect the anti-beta-amyloid monoclonal antibody bound to the solid phase; a method wherein a hybridoma culture supernatant is added to a solid phase to which the anti-immunoglobulin antibody or the protein A is adsorbed, and then, the beta-amyloid labeled with a radioactive substance, an enzyme or the like is added thereto to detect the anti-beta-amyloid monoclonal antibody bound to the solid phase; and the like. The selection and breeding of the anti-beta-amyloid monoclonal antibody is generally carried out in a medium for animal cells containing 10-20% fetal bovine serum (e.g., RPMI1640) by adding HAT (hypoxanthine, aminopterin and thymidine). The antibody titer of the hybridoma culture supernatant can be obtained in the same way as the case of anti-beta-amyloid antibody titer in the antiserum described above.

Separation and purification of the anti-beta-amyloid monoclonal antibody is carried out according to a method for separating and purifying immunoglobulin (e.g., salting out, an alcohol precipitation method, an isoelectric point precipitation method, electrophoresis, an adsorption/desorption method using an ion exchanger (e.g., DEAE), ultracentrifugation, gel filtration, a specific purification method wherein only an antibody is collected using an antigen binding solid phase or an active adsorption agent such as a protein A, protein G, KAPTIV-AE (TECNOGEN S.C.P.A.) and the like and the binding is dissociated to obtain the antibody, and the like), similar to the case of a normal polyclonal antibody.

Selection of a hybridoma generating the anti-beta-amyloid antibody reacting to a partial region of the beta-amyloid and a hybridoma generating the anti-beta-amyloid monoclonal antibody reacting to the beta-amyloid but not reacting to a partial region thereof can be carried out, for example, by measuring the binding ability of the peptide corresponding to the partial region and the antibody generated by the hybridoma.

Thus, the antibody of the present invention can be manufactured by culturing hybridoma cells of the warm-blooded animal in vivo or in vitro and collecting the antibody from the body fluid or the cultured material.

Thus obtained anti-beta-amyloid monoclonal antibody can be used as a prevention/treatment agent (including a development suppressing agent) for Alzheimer's disease, light cognitive disorder (MCI), brain amyloid angiopathy (CAA) and the like (preferably, Alzheimer's disease and the like). Further, the prevention/treatment agent is preferably a suppressing agent for aggregation or deposition of the beta-amyloid in the brain, an agent for specifically increasing the concentration of a peptide having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 5 in blood.

For these purposes, an antibody molecule itself can be used, and fractions of the antibody molecule such as $F(ab')_2$, Fab', Fab or the like can also be used. As the antibody of the present invention used for these purposes, an antibody permeating the blood-brain barrier (BBB) is preferred, and in particular, an antibody suppressing deposition of the beta-amyloid, an antibody inhibiting oligomer formation by the beta-amyloid, an antibody capable of removing the beta-amyloid from a formed senile plaque (or an antibody capable of deleting a senile plaque formed in the brain) and the like are more preferred. An antibody not permeating the blood-brain barrier (BBB) can also be used, and in this case, preferred is an antibody capable of capturing peripheral beta-amyloid in the periphery and promoting delivery of the beta-amyloid from an intracerebral region to the periphery.

Further, the above-described antibody permeating the blood-brain barrier (BBB) and capable of binding to the beta-amyloid in a formed senile plaque can also be used as an agent for directly diagnosing Alzheimer's disease, light cognitive disorder (MCI) and the like in a body. It is known that a diffuse senile plaque seen in the cases of very primitive Alzheimer's disease and light cognitive disorder (MCI) has the beta-amyloid (x-42) as the main component. Therefore, it is thought that early diagnosis of Alzheimer's disease and light cognitive disorder (MCI), which has been difficult to be realized, will be enabled by imaging the direct binding of an antibody specific to the C-terminus of the beta-amyloid (x-42), or $F(ab')_2$, Fab' or Fab fraction of the antibody molecule or the like with the diffuse senile plaque in a body using high field MRI and the like.

The prevention/treatment agent for Alzheimer's disease, light cognitive disorder (MCI), brain amyloid angiopathy (CAA) and the like (preferably for Alzheimer's disease and the like) comprising the antibody of the present invention has low toxicity, and it can be administered perorally or parenterally to a human or a mammal (e.g., rat, rabbit, sheep, pig, bovine, cat, dog, monkey and the like) as it is as a liquid agent, or as a pharmaceutical composition in a suitable form. The dosage varies depending on a target to be administered, a targeted disease, a symptom, an administration route and the like. For example, when using in order to treat an adult having Alzheimer's disease, the antibody of the present invention is advantageously administered parenterally generally in the dosage of about 0.01-20 mg/kg (body weight), preferably in the dosage of about 0.1-10 mg/kg (body weight), more preferably in the dosage of about 0.1-5 mg/kg (body weight), about 1-5 times per week, preferably about 1-4 times per month. A dosage similar thereto can be administered perorally. When a symptom is particularly serious, a dosage can be increased depending on the symptom.

The antibody of the present invention can be administered as it is or as a suitable pharmaceutical composition. The above-described pharmaceutical composition used for administration includes the above-described antibody or a salt thereof, and a pharmacologically acceptable carrier, a diluent or an excipient. Such a composition is provided in a form suitable for peroral or parenteral administration.

For example, the composition for peroral administration can be in a form of solid or liquid, concretely, a tablet (including a sugar-coated tablet and a film-coated tablet), a pill, a granule, a powder, a capsule (including a soft capsule), a syrup, an emulsion, a suspension and the like. Such a composition is manufactured using a publicly known method and comprises a carrier, a diluent or an excipient, which is generally used in the field of preparation. For example, as a carrier or an excipient used for a tablet, lactose, starch, sucrose, magnesium stearate and the like can be used.

The composition for parenteral administration can be in a form of, for example, an injection, a suppository and the like. Examples of injections include intravenous injection, subcutaneous injection, intradermic injection, intramuscular injection, instillation and the like. Such an injection can be prepared according to a publicly known method, for example, by dissolving, suspending or emulsifying the above-described antibody or a salt thereof in a sterile aqueous or oil solution generally used in an injection. As an aqueous solution for injection, for example, an isotonic solution and the like containing saline, glucose and other adjuvants can be used, and the solution can be used in combination with a suitable adjuvant for dissolution such as alcohol (e.g., ethanol), polyalcohol (e.g., propylene glycol and polyethylene glycol), nonionic surface active agent (e.g., polysorbate 80 and HCO-50 (polyoxyethylene (50 mol) adduct of hydrogenated castor oil)) and the like. As an oil solution for injection, for example, sesame oil, soybean oil and the like can be used, and they can be used in combination with an adjuvant for dissolution such as benzyl benzoate, benzyl alcohol and the like. A prepared solution for injection is generally put into a suitable ampule. A suppository used in rectal administration can be prepared by mixing the above-described antibody or a salt thereof with a common base for suppository.

The above-described peroral or parenteral pharmaceutical composition is advantageously prepared in the form having the administration unit suitable for the dosage of activation component. Examples of forms having such administration unit include a tablet, a pill, a capsule, an ampule, a suppository and the like, and preferably, the above-described antibody is contained in the amount of generally about 5-500 mg, in particular about 5-100 mg in the case of injection, and about 10-250 mg in the case of other forms, per each administration unit.

The aforementioned compositions can respectively contain other activation components as long as an undesired interaction does not occur by the compounding with the above-described antibody.

When amino acids and the like are indicated by abbreviations in the present specification, such indications are based on the abbreviations according to IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature or common abbreviations in this technical field. Examples thereof are described below. In the case wherein there may be an optical isomer of an amino acid, the abbreviation indicates the L body, unless otherwise specified.

PAM: phenylacetamidemethyl
Boc: t-butyloxycarbonyl
Z: benzyloxycarbonyl
Cl-Z: 2-chloro-benzyloxycarbonyl
Br-Z: 2-bromo-benzyloxycarbonyl
Bzl: benzyl
OcHex: cyclohexylester
OBzl: benzylester
Tos: p-toluenesulfonyl
HOBt: 1-benzotriazole
MeBzl: 4-methylbenzyl
Bom: benzyloxymethyl
DCC: N,N'-dicyclohexylcarbodiimide
TFA: trifluoroacetic acid
DMF: N,N-dimethylformamide

Gly: glycine
Ala: alanine
Val: valine
Leu: leucine
Ile: isoleucine
Ser: serine
Thr: threonine
Cys: cysteine
Met: methionine
Glu: glutamic acid
Asp: asparaginic acid
Lys: lysine
Arg: arginine
His: histidine
Phe: phenylalanine
Tyr: tyrosine
Trp: tryptophan
Pro: proline
Asn: asparagine
Gln: glutamine
SPDP: 3-(2-pyridyldithio) propionic acid N-succinimidyl
GMBS: N-(4-maleimidobutyryloxy) succinimido
BSA: bovine serum albumin
BTG: bovine thyroglobulin
EIA: enzyme immunoassay
HPLC: reversed-phase high performance liquid chromatography
HRP: horse radish peroxidase
FBS: fetal bovine serum
d-FBS: dialyzed fetal bovine serum
TMB: 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine

H/HBSS: Hepes buffered Hanks' balanced salt solution

SEQ ID NOS used in the present specification represent the following amino acid sequences of peptides.

[SEQ ID NO: 1] beta-amyloid (1-38)
[SEQ ID NO: 2] beta-amyloid (1-39)
[SEQ ID NO: 3] beta-amyloid (1-40)
[SEQ ID NO: 4] beta-amyloid (1-41)
[SEQ ID NO: 5] beta-amyloid (1-42)
[SEQ ID NO: 6] beta-amyloid (1-43)
[SEQ ID NO: 7] beta-amyloid (1-28)
[SEQ ID NO: 8] beta-amyloid (25-35)
[SEQ ID NO: 9] beta-amyloid (35-43)

The present invention will be described in more detail by indicating the Examples, but the Examples do not limit the scope of the present invention.

The monoclonal antibodies BC-05a and BA-27a used in the Examples were obtained according to the method described in Example 7 of International publication WO 94/17197 pamphlet.

Example 1

(1) Measurement of Aβx-40 and Aβx-42 using the sandwich method-EIA

The mouse monoclonal antibody BNT-77a (Asami-Odaka A. et al., Biochemistry, Vol. 34, pages 10272-10278, 1995) was obtained by immunizing a BALB/C mouse with the beta-amyloid (11-28) according to the method described in Example 7 of International publication WO 94/17197 pamphlet. 100 μl of 0.1 M carbonate buffer solution containing 15 μg/ml of the antibody and 100 μl of pH 9.6 solution were respectively poured onto a 96 well microplate and left at 4 ℃ for 24 hours. Extra binding sites on the well were inactivated by adding 300μl of

Block Ace (Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.) diluted 4-fold with PBS and being left at 4 ℃ for 24 hours. In order to measure Aβx-40, a dilution line of Aβ1-40 (Peptide Research Institute) diluted with buffer EC (0.02 M phosphate buffer containing 10 % Block Ace, 0.2 % BSA, 0.4 M NaCl, 0.05 % CHAPS, 2mM EDTA and 0.05 % NaN_3, pH7) and 100μl of test sample were added to the plate in which a primary antibody is immobilized as described above, and reacted at 4 ℃ for 24 hours. After washing with PBS, 100μl of BA-27a-HRP diluted 1000-fold with buffer C (0.02 M phosphate buffer containing 1 % BSA, 0.4 M NaCl and 2mM EDTA, pH 7) (see International publication WO 94/17197 pamphlet) was added thereto as a secondary antibody and reacted at room temperature for 6 hours. After washing with PBS, 100μl of TMB Microwell Peroxidase substance system (KIRKEGAARD & PERRY LAB, INC) was added thereto and reacted at room temperature for 10 minutes. The reaction was terminated by adding 100μl of 1 M phosphoric acid, and after that, the absorbance at 450 nm was measured by a plate reader (SPECTRAMAX 190, Molecular Device) to obtain the enzyme activity on the solid phase. In order to measure Aβx-42, a dilution line of Aβ1-42 (Peptide Research Institute) and the test sample were added to the BNT-77a immobilized plate prepared as described above, and BC-05a-HRP was used as a secondary antibody (see International publication WO 94/17197 pamphlet) to carry out the measurement in the same way as the case of Aβx-40.

(2) Concentration change of Aβx-40 and Aβx-42 in plasma and cerebrospinal fluid of a BALB/C mouse after intraperitoneal administration of BA-27a or BC-05a

The effect of the above-described antibody was studied using 19 individuals of 3-month-old BALB/C mice. 0.5 mg of BA-27a and 0.5 mg of BC-05a are administered intraperitoneally to 7 mice and 6 mice respectively. The remaining not-administered 6 mice were used as a control. 16 hours after the administration, plasma and cerebrospinal fluid (CSF) were collected from the mice under etherisation, and Aβx-40 and Aβx-42 were measured. Further, plasma of the mouse, to which BC-05a was administered intraperitoneally 4 times at 1 week intervals, was collected, and Aβx-42 was measured. Moreover, 10 μl of the plasma and 5μg of Dynabeads M280 anti-mouse Ig (Dynal) were reacted at room temperature for 2 hours to collect the supernatant, and the immunoglobulin non-binding types Aβx-40 and Aβx-42 in plasma and the immunoglobulin binding types Aβx-40 and Aβx-42 eluted with 0.2 M Glycine (pH 2.8) were measured.

Aβx-40 in plasma was 137.3±2.2 fmol/ml in the BA-27a administered group, 3.3±1.2 fmol/ml in the BC-05a administered group, and 3.4±1.8 fmol/ml in the normal control group.

Aβx-40 in cerebrospinal fluid was 670.8±252.6 fmol/ml in the BA-27a administered group, 166.5±140.1 fmol/ml in the BC-05a administered group, and 246±184.3 fmol/ml in the normal control group. Aβx-42 in plasma was 0.5±0.4 fmol/ml in the BA-27a administered group, 60.7±7.1 fmol/ml in the BC-05a administered group, and 0.2±0.2 fmol/ml in the normal control group.

Aβx-42 in cerebrospinal fluid was equal to or less than the measurement sensitivity in the BA-27a administered group, 0.6±0.4 fmol/ml in the BC-05a administered group, and equal to or less than the measurement sensitivity in the normal control group.

By administering BA-27a, Aβx-40 significantly increased 40 times in plasma and 2.7 times in cerebrospinal fluid ($p<0.001$). When administering BC-05a, no increase of Aβx-40 was observed in plasma or cerebrospinal fluid.

Aβx-42 did not increase in plasma or cerebrospinal fluid by administering BA-27a. When administering BC-05a, Aβx-42 significantly increased 304 times in plasma ($p<0.001$), and increased to 0.6±0.4 fmol/ml in cerebrospinal fluid, though it was equal to or less than the measurement sensitivity in the normal control group.

In the mouse, to which BC-05a was continuously administered for one month, only Aβx-42 in plasma increased to 324.1 fmol/ml (1621 times), and moreover, when the measurement was carried out by distinguishing the antibody non-binding type from the antibody binding type using an immune precipitation method, almost 100 % of the increased Aβx-42 was the antibody non-binding type.

The above-described results show that Aβx-42 in cerebrospinal fluid and Aβx-42 in plasma are specifically and remarkably increased by administering the anti- Aβ 42 C-terminal specific antibody BC-05a to a mouse intraperitoneally. Since Aβx-42 increased in plasma was the immunoglobulin non-binding type, Aβ x-42, to which the administered BC-05a bound in blood, was not measured.

Therefore, it is considered that the administered BC-05a specifically increased the clearance of Aβx-42 in the brain to lead to the increase of Aβx-42 in cerebrospinal fluid and Aβx-42 in plasma.

The results show that the concentration in the brain of Aβx-42, which is an onset initiation factor of Alzheimer's disease, can be selectively controlled by administering BC-05a, and that the deposition of brain amyloid Aβx-42, which has already been deposited to induce various pathological processes, can be selectively released and improved. Further, it is considered that new diagnosis methods such as selective imaging of senile plaque, selective estimation of deposition amount of brain amyloid Aβx-42 by intravascular administration of BC-05a and the like can be developed by applying the nature that the administered BC-05a binds to Aβx-42 in the brain.

Example 2

(1) Preparation of biotinylated BC-05a and biotinylated mouse IgG

40 μl of aqueous solution of sulfo-NHS-biotin (Pierce) (2.4 mg/120 μl) was added to 2 ml of BC-05a (10 mg/ml), and the mixture was reacted with stirring at room temperature for 30 minutes. The reaction solution was diluted and dialyzed against PBS(-) at 4℃ for 2 days, and after that, the concentration of antibody was measured. The yield was about 70 %. Mouse IgG (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) to be used for the control was similarly biotinylated.

(2) Serial administration of biotinylated antibody to a juvenile APPswTg (Tg2576) mouse in a short term, preparation of soluble fractions of cerebrum and measurement of the concentration of antibody in the brain

Biotinylated mouse IgG or biotinylated BC-05a (each 0.5

mg/0.2 ml/mouse) was intraperitoneally administered singly to a female Tg2576 mouse (12-week old) (Science, Vol. 274, pages 99-102, 1996), and 24 hours later, the blood thereof was collected, and the perfused cerebrum was collected, cut in two and frozen (n=4.5). To the blood, protease inhibitor cocktail (Complete, Roche) and EDTA (final concentration: 4 mg/ml) were added and mixed, and after centrifugation, the supernatant was frozen and preserved as plasma. 50 mM Tris-HCl-contained saline containing protease inhibitor cocktail (pH 7.5) (TS buffer) was added to the cerebral hemisphere at 4-fold amount of its weight and homogenized. After ultracentrifugation was carried out by 300,000 xg at 4℃ for 20 minutes, the supernatant was obtained as cerebral soluble fractions. The obtained fractions were added to an avidin-immobilized 96 well plate (Reacti-Bind NeutrAvidin Coated Plate, Pierce) and reacted at 4℃ overnight. After washing, anti-mouse IgG-HRP (Amersham) was added thereto and reacted at room temperature for 6 hours. After washing, the substrate of HRP (TMB Microwell Peroxidase substrate system, KPL) was added thereto. After the reaction was terminated by 1M phosphoric acid, the absorbance at 450 nm was measured by a plate reader, and the concentration of antibody in the brain was calculated using an attached calculation software (SoftMAX). The concentration of antibody in plasma was measured in the same way. The analytical curve obtained by defining BC-05a as the sample was produced, and the concentration results of biotinylated BC-05a obtained in the above-described (1) in plasma and the brain are shown in Table 1.

[Table 1]

	Biotinylated mouse	Biotinylated

	IgG-administered group (n=4) (pmol/g wet tissue)	BC-05a-administered group (n=5) (pmol/g wet tissue)
Plasma	1300±296	1030±94.8
Cerebral soluble fractions	6.42±0.475	4.75±0.056

mean±S.E.M.

From these results, it can be understood that around 0.5 % of the concentration of antibody in plasma migrated into the brain when any one of biotinylated BC-05a and biotinylated IgG is administered.

Example 3

Serial administration of BC-05a to a juvenile APPswTg (Tg2576) mouse for 9 months, preparation of cerebral extract and quantification of the concentration of Aβ in blood and the brain

Mouse IgG or BC-05a (until 15-week-old: each 0.5 mg/0.2 ml/mouse, 16-week-old or later: each 1.0 mg/0.2 ml/mouse) was administered intraperitoneally to a male Tg2576 mouse (10-week-old) (Science, Vol. 274, pages 99-102, 1996) once per week until the mouse became 52-week-old (12-month-old) (n=9-10). The sampling was carried out in the same way as that described above.

Soluble fractions and insoluble fractions of the cerebral extract were separated in the preparation. The soluble fractions were prepared in the same way as that in Example 2, the precipitation thereof after ultracentrifugation was washed with TS buffer, and after that, 50 mM Tris-HCl solution containing 6 M guanidine-hydrochloric acid (pH 7.5), whose amount is 8-fold of the weight of the cerebral hemisphere, was added thereto and dissolved. Centrifugation was carried out at 15000 rpm at 4℃ for 20 minutes, and the obtained supernatant was used as the insoluble fractions. The measurement of the concentration of Aβ was carried out according to the method described in Example 1. The cerebral insoluble fractions were diluted 2000-fold with buffer EC to use as a sample.

The concentration of Aβ in plasma was quantified using two methods, i.e., the method wherein the diluted plasma was quantified as it was, and the method wherein BC-05a complex was dissociated with guanidine-hydrochloric acid and diluted to be quantified. In the latter case, 30 μl of 50 mM Tris-HCl solution containing 8 M guanidine-hydrochloric acid (pH 7.5) was added to 10 μl of plasma, and after mixing them, 560 μl of buffer EC was further added thereto and diluted to obtain a sample of ELISA.

The results are shown in Table 2.

[Table 2]

		Aβx-40 (pmol/g wet tissue)	Aβx-42 (pmol/g wet tissue)
Plasma (no treatment)	IgG administered group	3160±302	389±20.0
	BC-05a administered group	2270±186	8810±224
Plasma (guanidine treatment)	IgG administered group	2990±208	588±29.0
	BC-05a administered group	2350±128	18800±1100

Cerebral soluble Aβ	IgG administered group	2.23±0.402	0.413±0.0521
	BC-05a administered group	2.29±0.27	0.643±0.0687
Cerebral insoluble Aβ	IgG administered group	1650±383	645±102
	BC-05a administered group	1200±347	442±57.4

mean±S.E.M.

Similar to the case of single administration, the concentration of Aβ in plasma significantly increased from 22 times to 32 times by administering BC-05a. By treating the plasma with guanidine, the concentration of Aβx-42 in plasma of the BC-05a administered group further increased about 2 times. Therefore, it is considered there is a possibility that BC-05a contributes to the stabilization of Aβx-42 in blood.

No change was observed in the concentration of soluble Aβx-40 in the brain, but the concentration of insoluble Aβ x-40 showed the tendency for decrease. Regarding the concentration of Aβx-42 in the brain, significant increase was observed in the case of soluble fractions, and the tendency of decrease was observed in the case of insoluble fractions.

Industrial Applicability

By using the monoclonal antibody specifically reacting to a partial peptide of the C-terminus of the beta-amyloid or a derivative thereof and not recognizing a partial peptide having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 8, the beta-amyloid having the C-terminal hydrophobic region can be specifically recognized. The antibody is useful for a preventive/therapeutic agent or a diagnostic agent for Alzheimer's disease and the like. Further, though the efficiency of movement outside the brain via blood brain barrier by the beta-amyloid (x-42) is anticipated to be low due to the low ratio thereof in soluble fractions of cerebrospinal fluid and the like, there is a possibility that the above-described antibody selectively increases only the concentration of the beta-amyloid (x-42) in blood and decreases the insoluble beta-amyloid (x-42) in the brain. Moreover, the above-described antibody rarely reacts to the cerebrovascular amyloid containing the beta-amyloid (x-40) as the main component, and therefore, it is considered that the antibody does not induce bleeding from vessels in the brain including brain amyloid angiopathy.

(TRANSLATION)

English translation of the claims of WO 2005/25616

1. A preventive/therapeutic agent for Alzheimer's disease, light cognitive disorder or brain amyloid angiopathy comprising a monoclonal antibody specifically reacting to a partial peptide of the C terminus of a beta amyloid or a derivative thereof, and not recognizing a partial peptide having the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 8.

2. The agent according to Claim 1 which is a preventive/therapeutic agent for Alzheimer's disease.

3. The agent according to Claim 1 which is an antibody not recognizing a partial peptide having the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 9.

4. The agent according to Claim 1 which is an antibody recognizing a partial peptide having the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 9.

5. The agent according to Claim 1, wherein the beta-amyloid is a peptide having an amino acid sequence of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 or SEQ ID NO: 6.

6. The agent according to Claim 1, wherein the beta-amyloid is a peptide having an amino acid sequence of SEQ ID NO: 5.

7. The agent according to Claim 1, wherein the beta-amyloid derivative is a peptide having the amino acids No. 42-43 of the amino acid sequence of SEQ ID NO: 5; the amino acids No. 3-42 of the amino acid sequence of SEQ ID NO: 5 having N-terminal glutamic acid substituted with pyroglutamic acid; or the amino

acids No. 4-42 of the amino acid sequence of SEQ ID NO: 5.

8. The agent according to Claim 1, wherein the beta-amyloid derivative is a peptide having an amino acid sequence of any one of SEQ ID NO: 1-6 wherein amino acid No. 1-10 are deleted therefrom, and has a N-terminal glutamic acid substituted with pyroglutamic acid.

9. The agent according to Claim 1, wherein the beta-amyloid or the derivative thereof has a C-terminal partial peptide which is a partial peptide having an amino acid sequence of amino acid position No. 25 or later from the N-terminus of the beta amyloid.

10. The agent according to Claim 1 which is an antibody not recognizing a partial peptide having the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 7.

11. The agent according to Claim 1 which is an antibody recognizing a beta amyloid (1-42) having the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 5.

12. The agent according to Claim 1 which is monoclonal antibody BA-27a producible from a hybridoma set forth under BA-27 (FERM BP-4139).

13. The agent according to Claim 1 which is monoclonal antibody BA-25a producible from a hybridoma set forth under BA-25 (FERM BP-4457).

14. The agent according to Claim 1 which is an antibody permeable to the blood brain barrier.

15. The agent according to Claim 14 which is an antibody capable of removing beta amyloid from a formed senile plaque.

16. The agent according to Claim 1 which is an inhibitor of aggregation or deposition of beta amyloid in the brain.

17. The agent according to Claim 1 which is capable of specifically increasing the blood concentration of a peptide having the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 5.

18. The agent according to Claim 1 which is an antibody impermeable to the blood brain barrier.

19. The agent according to Claim 18 which is an antibody capable of capturing peripheral beta amyloid in the peripheral.

20. A method of preventing/treating Alzheimer's disease, light cognitive disorder or brain amyloid angiopathy comprising the step of administering to a mammal an effective amount of a monoclonal antibody specifically reacting to a partial peptide of the C terminus of a beta amyloid or a derivative thereof, and not recognizing a partial peptide having the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 8.

21. Use of a monoclonal antibody specifically reacting to a partial peptide of the C terminus of a beta amyloid or a derivative thereof, and not recognizing a partial peptide having the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 8 for manufacturing a preventive/therapeutic agent of Alzheimer's disease, light cognitive disorder or brain amyloid angiopathy.

22. The agent according to Claim 1 which is an antibody recognizing beta amyloid (1-42) having the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 5, but not recognizing beta amyloid (1-38) having the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 1, beta amyloid (1-39) having the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 2, or beta amyloid (1-40) having the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 3.